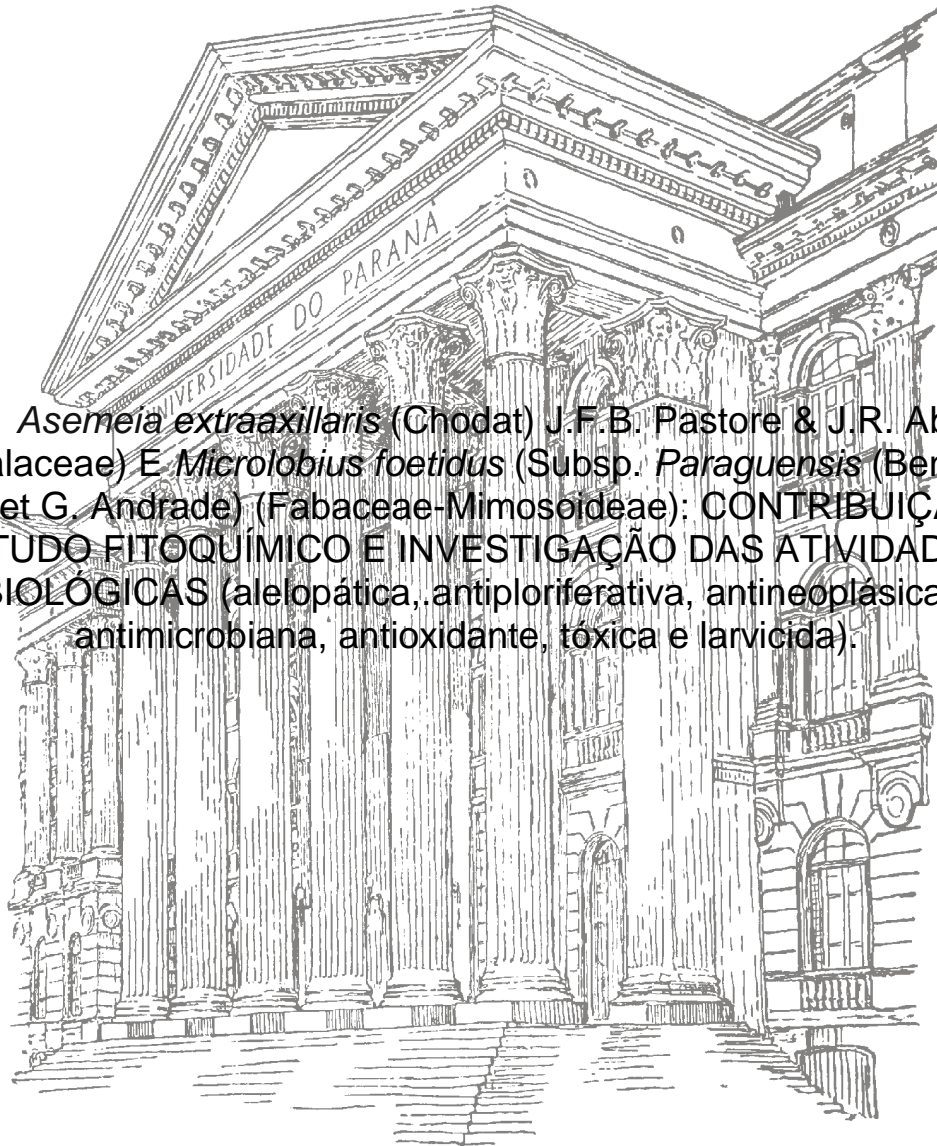


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CRISTIANE BEZERRA DA SILVA



*Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott  
(Polygalaceae) E *Microlobius foetidus* (Subsp. *Paraguensis* (Benth.) M.  
Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): CONTRIBUIÇÃO AO  
ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica,  
antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida).

CURITIBA  
2014

CRISTIANE BEZERRA DA SILVA

*Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott  
(Polygalaceae) E *Microlobius foetidus* (Subsp. *Paraguensis* (Benth.) M.  
Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): CONTRIBUIÇÃO AO  
ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS (alelopática,.antiploriferativa, antineoplásica,  
antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida).

Tese apresentada para ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel  
Co-Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes  
Miguel

CURITIBA  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS / BIBLIOTECA CENTRAL  
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Silva, Cristiane Bezerra da

*Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (polygalaceae) e *Microlobius foetidus* (subsp. *paraguensis* (benth.) M. Sousa et G. Andrade) (fabaceae-mimosoideae) : contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida) / Cristiane Bezerra da Silva. – Curitiba, 2014.

314f.: il. algumas color., grafs., tabs.; 31 cm.

Orientadora: Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui referências

1. Pau-alho – Pantanal Mato-grossense (MS e MT). 2. Mentol-do-campo. 3. Flavonóides. 4. Alelopatia. 5. Herbicidas. 6. Agentes antineoplásicos. I. Miguel, Marilis Dallarmi, 1966-. II. Miguel, Obdúlio Gomes, 1952-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 615.321





# TERMO DE APROVAÇÃO

**CRISTIANE BEZERRA DA SILVA**

Título: "*Asemeia extraaxillaris* CHODAT (POLYGALACEAE) E *Microlobius foetidus* (SUBSP. Paraguensis (BENTH) M. SOUZA ET G. ANDRADE) (FABACEAE- MOMOSOIDEAE): CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS (alelopática, antiproliferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvívica)"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Profª. Drª. Mariis Dallarmi Miguel  
(Orientadora)

Prof. Dr. Euclésio Simionatto  
(Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul)

Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos  
(Universidade Federal do Paraná)

Profª. Drª. Eliane Carneiro Gomes  
(Universidade Federal do Paraná)

Profª. Drª. Sandra Maria Warumby Zanin  
(Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 20 de fevereiro de 2014.

Aos meus amados pais. Por não terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui e vencer.

## AGRADECIMENTOS

O Doutorado é a última oportunidade de expressar os mais sinceros agradecimentos, à todos aqueles que participaram da minha jornada acadêmica, além dos amigos e familiares, que foram e são o meu pilar de sustentação nessa caminhada.

Dessa forma, quero agradecer primeiramente à **Deus**, por ter guiado os meus caminhos desde o meu nascimento, pelo amor incondicional, pelos cuidados com o meu futuro, por ter me guardado dos perigos dessa vida, e por me permitir vivenciar toda essa experiência...

Aos meus pais, **Jaime** (*in memoriam*) e **Geni**. Pai, você foi minha inspiração, sempre abriu mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, te agradeço pelo pouquinho que pode me dar, e por ter me ensinado a não desistir daquilo que eu busco. Mãe, você foi meu exemplo, nunca vou esquecer as inúmeras vezes em que batalhou e muito para que eu chegasse até aqui, por todos os cuidados, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha que me tornou quem sou. Obrigada pelo amor incondicional que você me dá todos os dias.

Aos meus queridos irmãos **Cláudia** e **Paulo Henrique**, e meu cunhado **Heleno**. Cláudia, minha irmã mais velha, tão dedicada e persistente, sempre com o seu coração bondoso para ajudar a quem precisa, e por ter me acompanhado desde a minha infância. Obrigado pela convivência e por fazer parte da minha vida. Paulo, o caçula bagunceiro que me prega peças e me assusta, obrigada por todo o companheirismo, e por ser mais velho do que eu em algumas situações. Heleno, meu cunhado e irmão. Melhor cunhado que vc não existiu. Obrigada por fazer parte da minha família, pelo incentivo, apoio incondicional e sempre me apoiar.

As minhas tias **Valda**, **Arlene**, **Maria**, **Clarice** e **Nilce**, e minhas primas **Márcia** e **Marcela** pela ajuda na saúde e na doença. Nem sei o que teria feito sem vocês.

À minha avó materna **Maria**, guerreira, batalhadora, muito obrigada pelo pouquinho que pode me dar, pelas conversas, uma infância feliz e comidinhas caseiras.

Aos meus avôs paternos **Adolfo** e **Cida**, pelas boas lembranças da infância, brincadeiras, amor incondicional e conselhos.

Ao meu querido **David**, pelo companheirismo, amor, pela paciência nas horas das crises, por estar comigo na saúde e na doença, pela cumplicidade, e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não aparecer. Você foi a pessoa que compartilhou comigo os momentos de tristezas e alegrias. Além deste trabalho, dedico todo meu amor a você.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Marilis Dallarmi Miguel** pela confiança, amizade, ajuda e incentivo, pela orientação constante ao longo de minha jornada

científica, por me receber em seu laboratório e acima de tudo confiar- me esta oportunidade.

A professora Dr<sup>a</sup> **Marize Terezinha Pereira Peres** pela primeira oportunidade para ingressar no mundo da Pós Graduação, pelos importantes ensinamentos e acima de tudo a amizade conquistada.

Ao Co-orientador Prof<sup>o</sup> Dr. **Obdúlio Gomes Miguel** pela confiança, paciência, amizade, oportunidades de conhecimento, pelos puxões de orelha que sem dúvida foram valiosíssimos.

As professoras Dr<sup>a</sup> **Josiane de Fátima G. Dias**, obrigada por toda ajuda no laboratório, amizade e boa convivência, **Sandra Maria Warumbi Zanin**, obrigada pela amizade, risos, conversas alegres. À ambas eu agradeço pro fazerem parte da minha vida.

Ao **Pedro Zanin**, “seu Pedro” meu especial agradecimento pela valiosa ajuda e paciência na parte fitoquímica. Pelo exemplo de paciência e ser extraordinário! Tua especial contribuição é parte deste trabalho! Muito obrigada por tudo.

Ao Professor **Gedir de O. Santos** e **Vitor Alberto Kerber**, pelo auxílio em casa de vegetação, correções nos artigos, por todo o tempo dispensado na execução deste trabalho.

A professora Dr<sup>a</sup> **Érika Amano**, por me receber em seu laboratório, me ajudar, incentivar. Obrigada por todos os conselhos profissionais, que com certeza carregarei por toda a vida.

Ao Prof Dr<sup>o</sup> e amigo **Euclésio Simionatto**, por toda a ajuda dispensada na execução deste trabalho, pela amizade e por estar disposto a ajudar sempre! Te agradeço pelas análises dos óleos voláteis e fixos, e além de tudo a amizade.

A professora Dr<sup>a</sup> **Sônia Corina Hess**, pela ajuda nos momentos de aperto, amizade e acima de tudo exemplo de ser humano...

A minha especial amiga **Ana Carina da Silva Cândido**, pelos ensinamentos, toda a confiança em mim depositada e principalmente a amizade conquistada.

Aos amigos queridos e conquistados durante o doutorado: **Marianna Erban**, **Alice Freitas**, **Geni**, **Augusto**, **Cris Peitz**.

As professoras **Maria de Fátima Cepa Matos**, **Nilva Ré- Poppi** e mestre **Sâmia Soler Gebara**, por todas as análises e ajuda.

As minhas amigas queridas de laboratório: **Thais Fernanda Moreira**, **Juliana Danna Kulik**, **Mayslian**, **Luciane** e **Fernanda O. Campos**, pelos momentos de descontração. Nem sei o que teria feito sem a ajuda de vocês. Ju, vc sempre esteve comigo durante o doutorado, sempre me deu conselhos e sempre me colocou pra cima. Muito obrigada pela ajuda. Lu, minha grande amiga. Obrigada por fazer parte



da minha vida e estar aqui para me ajudar sempre. Há poucas pessoas capazes de prestar homenagem ao sucesso de um amigo, sem qualquer inveja... e você é uma destas pessoas. Fer, nem sei por onde começar a te agradecer... Obrigada pelos momentos alegres e de descontração, pela ajuda nos RMNs, por ter passado teus fins de semana me ajudando nas análises. Estarei aqui sempre que precisar.

Ao Professor **Anderson** da química, pela valiosa ajuda na elucidação dos RMNs e pelo empréstimo de aparelhos para análises...

Aos técnicos de laboratório **Paulo Diniz, Nilson** (anatomia vegetal) e especialmente a **Maria das Graças**, pela ajuda, incentivo e conversas de descontração. Muito obrigada!

Aos demais colegas de laboratório **Francis, Beatriz, Vinícius e Camila de Jesus**, por estarem comigo no meu dia-a-dia.

À minha querida amiga **Kátia Fialho do Nascimento**, pela ajuda nos experimentos, pelas idéias trocadas, conversas descontraídas, dividindo as incertezas sobre o futuro após o doutorado.

À amida **Rita de Cássia Dallago Machado**, pelos conselhos, paciência e amizade. Obrigada por me ajudar no início da minha vida profissional, me mostrando as melhores formas de resolver situações.

As estagiárias **Suellen Friedrich, Andressa Christofis e Katlin Suellen Rech**, por todo o auxílio, amizade e compreensão, por toda a ajuda. Katlin, meu especial agradecimento a você por estes dois anos trabalhados, pela tua paciência. Muito obrigada por estar comigo sempre!

Aos professores de meu mestrado em Biologia vegetal (UFMS), em especial **Ângela Sartori, Edna Scremin, Rosangela Sigrist e Geraldo Alves Damasceno**, pela humildade, amizade e incentivo sempre! Aos Professores queridos **Arnildo Pott e Vali Joana Pott**, por toda a indicação das espécies em estudo, pelos e-mails de incentivo e pela essencial contribuição na minha formação pessoal. Professor Arnildo, muito obrigada pela inspiração, pelos conselhos de campo, pelos e-mails de incentivo durante essa longa jornada.

Enfim, deixei por ultimo, mas não menos importante: Aurora, Josimara, **Ana Cristina, Geciane, Fábio, Wellington, Rodrigo Régis, Esther e Leila...** Vocês estiveram comigo sempre, mesmo longe, sempre mantiveram contato, me ajudando, incentivando, descontraíndo. Agradeço por toda a ajuda, pelo apoio incondicional e acima de tudo a amizade verdadeira. Muito obrigada por tudo!

Aos docentes do **Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPR**, pelo conhecimento científico adquirido e a todos os **funcionários da UFPR** que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

As “**tias**” da limpeza, pelas conversas agradáveis e pelo companheirismo durante esse tempo, meu especial agradecimento à senhora **Helena**, por todas as orações feitas.

**Rosa, Rosinha...** Como esquecer de te agradecer? Muito obrigada pela ajuda nas coletas, pelas conversas, por me receber em sua casa e andar no caminhão de lixo!! Sem dúvida essa história ficou pra sempre!

Ao botânico **Osmar dos Santos Ribas**, e novamente ao Prof Drº **Arnildo Pott**, pela identificação das espécies em estudo.

A **CAPES** e **UFPR**, que custeou a minha bolsa de estudos, facilitando muito a realização deste trabalho.

Ao Dr. **José Bento Pereira Lima** do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores- FIOCRUZ, pelo envio de material para os ensaios com *Aedes aegypti*.

Agradeço a todos e espero não ter esquecido ninguém, pois muitos foram aqueles que me ajudaram a concluir esta etapa profissional, que me abriu as portas para um novo objetivo, um caminho que estou construindo com muito esforço e dedicação.

“Aos que se tornaram familiares, aos que  
nasceram familiares e aos que conheci antes de  
ontem;

Aos que me deixaram louca e aos que  
enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou  
outro que aturou minha “chatura”;

Aos amigos que passaram e aos que se  
estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que  
me fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos  
que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos  
que estão o tempo todo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês. E  
se não é melhor, é por falta de memória, mas  
não por falta de amigos”.

(Efraim Rodrigues)

## RESUMO

Dada a importância de estudos fitoquímicos e biológicos, associados à riqueza da flora do Pantanal Sul- Matogrossense, foram realizados estudos quanto a prospecção fitoquímica e atividades biológicas dos extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH) clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR) de *Asemeia extraaxillaris* e diferentes partes morfológicas de *Microlobius foetidus* (folhas, cascas, frutos e sementes), por meio de ensaios de atividade alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida. Na atividade alelopática, *A. extraaxillaris* apresentou potencial alelopático pelo método de lixiviados em laboratório e casa de vegetação, e o pó das raízes foi quem mais afetou a germinação (26% de inibição), crescimento inicial (54,3% de inibição) em laboratório e crescimento em casa de vegetação, inibindo o crescimento da raiz (50%) e caule (56%). Frutos e sementes de *M. foetidus* apresentaram inibição da raiz (57%) e caule (55%) tratados com o pó dos frutos. Ambas as espécies apresentam potencial antioxidante pelos métodos testados, sendo os resultados obtidos para *M. foetidus* superiores à *A. extraaxillaris*. Plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram alterações na anatomia após 30 dias. A espessura da epiderme córtex, diâmetro do cilindro vascular e diâmetro total foi menor em plantas tratadas de com a FH e FAE de *A. extraaxillaris*, e efeitos semelhantes foram observados para a FAE dos frutos de *M. foetidus*. A ação antineoplásica dos extratos e frações também foi verificada para ambas as espécies investigadas. A FAE de *A. extraaxillaris* apresentou IC<sub>50</sub> iguais a 7,5 µg. mL para a linhagem NCI-ADR/RES (Câncer de ovário com fenótipo de resistência à múltiplas drogas) e 8,5 µg. mL para a linhagem 786-0 (câncer de rim). Semelhante ao observado para *A. extraaxillaris*, as diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também demonstraram atividade antineoplásica, com IC<sub>50</sub> de 6,4 µg. mL para NCI-ADR/RES 8,3 µg. mL para a linhagem OVAR3 (Ovário) e 2,1 µg. mL para K562 (leucemia). Estes dados corroboram com os obtidos na proteção contra os efeitos do herbicida atrazina no modelo *A. cepa*, uma vez que o uso deste herbicida pode levar à formação de células cancerígenas. A ação antimicrobiana também foi observada. A FH e FCL de *A. extraaxillaris* apresentaram CIM (concentração inibitória mínima) iguais à 250 µg. mL para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e *C. neoformans*. Folhas e cascas de *M. foetidus* também apresentaram CIM semelhantes para a FCL, FAE e FR. A FH das folhas apresentou CIM de 125 µg.mL para *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e FAE de *M. foetidus* também inibiram a divisão celular quando testadas na regeneração cefálica de *D. tigrina*, e a atividade larvicida frente à *A. aegypti* também foi observada, com inibição acentuada da tripsina e quimiotripsina. Os óleos voláteis e FAE de *M. foetidus* apresentaram 100% de mortalidade para a concentração de 100µg.m, e uma menor síntese de tripsina quimiotripsina e acetilcolinesterase foram observadas. As larvas também espessamento da membrana peritrófica e diminuição do tecido epitelial. Os resultados indicam que ambas as espécies possuem alto potencial biológico, sugerindo seu emprego na área farmacêutica e agrônômica.

**Palavras-chave:** Mentol do campo; pau- alho, flavonóides, potencial pesticida, alelopatia.

## ABSTRACT

Due to the importance of biological and phytochemical research, associated to the plant richness in the Pantanal region, located at the Mato Grosso do Sul state, studies related to phytochemical prospecting and biological activities, of the crude ethanolic extract (EEB) and the hexanic (FH), chlorophorm (FCL), ethyl acetate (FAE) and remaining (FR) fractions from *Asemeia extraaxillaris* and different morphological portions of *Microlobius foetidus* (leaves, barks, fruits and seeds) were performed; by allelopathic, antiproliferative, antineoplastic, antimicrobial, antioxidant, toxic and larvicide activity assays. Regarding allelopathic activity, *A. extraaxillaris* presented an allelopathic potential, by the leachate method, in laboratory as well as greenhouse, and the root powder was the one which most affected the germination (26% of inhibition), early growth (54.3% of inhibition) both in the laboratory and in the greenhouse, inhibiting root (50%) and stem (56%) growth. Fruits and seeds from *M. foetidus* showed inhibition of the root (57%) and stem (55%), when treated with the fruit powder. Both species showed antioxidant potential by the tested methods, with better results obtained from *M. foetidus* when compared to *A. extraaxillaris*. Plants that were cultivated in greenhouses showed alterations in their anatomy after 30 days. The cortical epidermal thickness, vascular cylinder diameter, and total diameter was lower in plants treated with FH and FAE of *A. extraaxillaris*, and similar effects were observed for the FAE from fruits of *M. foetidus*. The antineoplastic action of the extracts and fractions was also verified in both investigated species. The FAE of *A. extraaxillaris* presented an  $IC_{50}$  of  $7.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the NCI-ADR/RES lineage (Ovary cancer with phenotype for multidrug resistance) and of  $8.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for the 786-0 lineage (Kidney cancer). Similarly to what was observed in *A. extraaxillaris*, the different morphological portions of *M. foetidus* also demonstrated antineoplastic activity, with an  $IC_{50}$  of  $6.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for NCI-ADR/RES, of  $8.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for the OVAR3 lineage (ovary) and  $2.1 \mu\text{g.mL}$  for K562 (leukemia). These data corroborate those obtained in the protection against the effects of the herbicide atrazine in the *A. cepa* model, as the use of this herbicide can lead to the formation of cancer cells. Antimicrobial action was observed as well. The FH and FCL of *A. extraaxillaris* presented a MIC (minimum inhibitory concentration) of  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e *C. neoformans*. Leaves and barks from *M. foetidus* also showed MIC values similar to FCL, FAE and FR. The FH of the leaves showed a MIC of  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for *S. aureus* and *K. pneumoniae*. The extracts and fractions of *A. extraaxillaris* and FAE of *M. foetidus* also inhibited cellular division when tested in the cephalic regeneration of *D. tigrina*, and larvicide activity upon *A. aegypti* was also observed, with a pronounced inhibition of trypsin and chymotrypsin. The volatile oils and FAE of *M. foetidus* showed 100% mortality for the concentration of  $100 \mu\text{g.mL}$ , and a lower trypsin, chymotrypsin and acetylcholine synthesis was observed. The larvae showed of peritrophic membrane and decreasing of epithelial tissue. The results indicate that both species have high biological potential, suggesting their use in the pharmaceutical and agronomic areas.

**Key words:** Mentol do campo; pau-alho, flavonoids, pesticide potential, allelopathy.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- SUB-REGIÕES DO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL.....	44
FIGURA 2- MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Asemeia extraaxillaris</i> . A) HÁBITO; B e C) LÂMINA FOLIAR; D) FLOR; E) SÉPALAS ABAXIAIS; F) SÉPALAS INTERNAS; G) PÉTALAS LATERAIS UNIDAS PELO DORSO ÀS MARGENS DA BAINHA DO ANDROCEU; H) SÉPALA ADAXIAL; I) GINECEU; J) CARENA; K) FRUTO COM O CÁLICE PERSISTENTE E ÊNFASE DA POSIÇÃO DE SUAS SEMENTES; M) SEMENTE; N) CORTE TRANSVERSAL DO TERÇO APICAL DO FRUTO.....	49
FIGURA 3- MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Microlobius foetidus</i> . A) HÁBITO; B) FACE ADAXIAL; C) FACE ABAXIAL; D) RAMO COM FOLHAS; E) FRUTO; F) CORTE LONGITUDINAL DO FRUTO; G) INFLORESCÊNCIA; H) FLOR.....	51
FIGURA 4- ESTRUTURA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE .....	53
FIGURA 5- FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	74
FIGURA 6 CROMATOGRAMA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>A. extraaxillaris</i> OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO.....	115
FIGURA 7- ESTRUTURA DA MOLÉCULA 1-(2-HIDROXIFENIL)-ETANONA.....	116
FIGURA 8- ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA 1 -(2-HIDROXIFENIL)-ETANONA.....	117
FIGURA 9- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA 1 - (2-HIDROXIFENIL)-ETANONA).....	117
FIGURA 10- CROMATOGRAMA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO (A) E MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (B).....	118
FIGURA 11- ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS 1,2,4-TRITIOLANO (A), 1,2,5,6-TETRATIOCANO (B) E 1,2,4,6-TETRATIEPANO (C) PRESENTES NOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE <i>M. foetidus</i> .....	120
FIGURA 12- PERFIL CROMATOGRÁFICO PARA ÁCIDOS GRAXOS DO	



EXTRATO HEXÂNICO (EH) OBTIDO DAS SEMENTES DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	124
FIGURA 13- CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA PARA ANÁLISE DE FLAVONÓIDES, E ÁCIDO GÁLICO PARA ANÁLISE DE FENÓIS TOTAIS.....	126
FIGURA 14- ESTRUTURA DO CANFEROL-3-B-D-GLUCOSE.....	131
FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO – d6).....	131
FIGURA 16- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO –d6).....	132
FIGURA 17- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO –d6).....	132
FIGURA 18- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO –d6).....	133
FIGURA 19- ESPECTRO DE DEPT135 DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO –d6).....	134
FIGURA 20- ESPECTRO DE RMN DE 1H DA SUBSTÂNCIA <b>m35</b> (600MHz, MeOD).....	136
FIGURA 21- ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA <b>m35</b> (600MHz, MeOD).....	137
FIGURA 22- ESPECTRO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA <b>m35</b> (600MHz, MeOD).....	137
FIGURA 23- ESTRUTURA DA CATEQUINA IDENTIFICADA NA AMOSTRA <b>m35</b> , DENOMINADA <b>m1</b> .....	138
FIGURA 24- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M1, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 5,95 ppm E EM 5,85 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).....	139
FIGURA 25- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M1, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 6,76 ppm e EM 6,84 ppm E O DUPLO DUBLETO EM 6,72 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).....	139
FIGURA 26- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M035, MOSTRANDO OS DUPLO DUBLETOS EM 2,50 ppm e	

EM 2,85 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).....	140
FIGURA 27- ESTRUTURA DA DIHIDROBINETINA IDENTIFICADA NA AMOSTRA m35, DENOMINADA m2.....	142
FIGURA 28- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 6,29 ppm E EM 6,84ppm, ALÉM DO DUPLO DUBLETO EM 6,33ppm, E AS RESPECTIVAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).....	143
FIGURA 29- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO O DUBLETO EM 6,39 ppm E SUA CORRELAÇÃO DIRETA (600MHz, MeOD).....	144
FIGURA 30- APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO OS DUPLO DUBLETOS EM 2,66 ppm e EM 2,86 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).....	66
FIGURA 31- TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS (A), E ATIVIDADES DA CATALASE (B), PEROXIDASE (C), SUPERÓXIDO DISMUTASE (D), GLUTATIONA REDUZIDA (E), CARBOIDRATOS SOLÚVEIS (F), PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (G) E CONTEÚDO DE PROLINA (H) DE <i>B. decumbens</i> , COLETADAS EM DIFERENTES DISTÂNCIAS DE <i>M. foetidus</i> . MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	145
FIGURA 32- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>Asemeia extraaxillaris</i> NA GERMINABILIDADE (A), CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (B), MESOCOTILO (C) E MASSA SECA (D). *MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	150
FIGURA 33- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>A. extraaxillaris</i> NA ATIVIDADE DA GLUCANASE (A) FENILALANINA AMÔNIO- LIASE (B), CATALASE (C) E PEROXIDASE (D). MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	154
FIGURA 34- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>A. extraaxillaris</i> NO ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (A) SUPERÓXIDO DISMUTASE (B)	

E PROTEÍNAS TOTAIS EM PLÂNTULAS DE *B. decumbens*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

156

FIGURA 35- ALTERAÇÕES MUTAGÊNICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *B. decumbens*, SUBMETIDAS AOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. extraaxillaris*. **A:** CÉLULA POLINUCLEADA, **B:** CÉLULA POLINUCLEADA COM MICRONÚCLEO, **C:** CÉLULA COM BROTO NUCLEAR, **D:** ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, **E E F:** CÉLULA COM NÚCLEO AMEBÓIDE, **G:** CÉLULA AMEBÓIDE, **H:** ANÁFASE MULTIPOLAR, **I:** CÉLULA POLIPLÍDE COM PERDA CROMOSSÔMICA, **J:** METÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA, **K:** TELÓFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, **L:** CÉLULA EM METÁFASE E MICRONÚCLEO EM PRÓFASE.....

161

FIGURA 36- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA GERMINABILIDADE (A,B), CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (C,D), HIPOCÓTILO/MESOCÓTILO (E,F) E MASSA SECA (G,H) DE *I. cordifolia* E *B. decumbens*. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

163

FIGURA 37- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA EMERGÊNCIA (A,B), CRESCIMENTO DA RAIZ (C,D), PARTE AÉREA (E,F) E MASSA SECA (G,H) DE *I. cordifolia* E *B. decumbens* EM CASA DE VEGETAÇÃO. MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

164

FIGURA 38- NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (A,B), PRÓFASE (C,D), METÁFASE (E,F), ANÁFASE (G,H) E TELÓFASE (I,J) EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES *I. cordifolia* E *B. decumbens*, EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus*. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

167

FIGURA 39- EFEITOS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CELULARES EM *I. cordifolia* - PRÓFASE NORMAL (A), C-MITOSE (B), QUEBRA CROMOSSÔMICA (C), METÁFASE PEGAJOSA (D), ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA (E), CÉLULA POLINUCLEADA (F), ANÁFASE MULTIPOLAR (G), NÚCLEO DISFORME (H)- E *B. decumbens*- TELÓFASE NORMAL (J), ANÁFASE COM

PERDA CROMOSSÔMICA (K), C- MITOSE (L), ANÁFASE NORMAL (M), ANÁFASE COM PERDA DE FILAMENTO CROMOSSÔMICO (N), TELÓFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA (O), PRÓFASE COM ADERÊNCIA CROMOSSÔMICA (P,Q), METÁFASE PEGAJOSA (R), ANÁFASE PEGAJOSA (S), CÉLULAS EM APOPTOSE (T,U), CÉLULA POLIPLÓIDE (V, X, P).....	170
FIGURA 40- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>Microlobius foetidus</i> NO TEOR DE CLOROFILA (A), SÍNTESE DE FORMAZAN (B), PROTEÍNAS TOTAIS (C), A-AMILASE (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E POLIFENOLOXIDASE (F) EM PLÂNTULAS DE <i>I. cordifolia</i> E <i>B. decumbens</i> EM LABORATÓRIO. *MEDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	172
FIGURA 41- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>Microlobius foetidus</i> NO TEOR DE CLOROFILA (A), SÍNTESE DE FORMAZAN (B), PROTEÍNAS TOTAIS (C), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E POLIFENOLOXIDASE (F) EM PLÂNTULAS DE <i>I. cordifolia</i> E <i>B. decumbens</i> EM LABORATÓRIO. *MEDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	173
FIGURA 42- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE <i>A. extraaxillaris</i> , CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O CRESCIMENTO DA RAIZ (A, C) E HIPOCÓTILO (B,D) DE <i>I. cordifolia</i> EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	180
FIGURA 43- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE <i>I. cordifolia</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	183
FIGURA 44- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE <i>Microlobius foetidus</i>	

- SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.\*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 184
- FIGURA 45- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* E FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE O CRESCIMENTO DA RAIZ E PARTE AÉREA DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 187
- FIGURA 46- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE(C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 192
- FIGURA 47- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 193
- FIGURA 48- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DE *A. extraaxillaris* NO CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 200
- FIGURA 49- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO

- ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ, HIPOCÓTILO E MASSA SECA DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 201
- FIGURA 50- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DAS CASCAS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ, HIPOCÓTILO E MASSA SECA DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 202
- FIGURA 51- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 203
- FIGURA 52- EFEITOS OBSERVADOS EM PLÂNTULAS DE *C. argenteus* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* E *M. foetidus*. A- CONTROLE, B- FH *A. extraaxillaris*; C- FAE *A. extraaxillaris*; D- FAE FRUTOS *M. foetidus*; E- FCL FRUTOS *M. foetidus*; F- FAE FOLHAS *M. foetidus*..... 204
- FIGURA 53- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DE *A. extraaxillaris* NO CRESCIMENTO DA RAÍZ (A) E MASSA SECA (B) DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )..... 209
- FIGURA 54- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS E FRUTOS DE *M. foetidus* NO



CRESCIMENTO DA RAÍZ (A-FOLHAS, B-FRUTOS) E MASSA SECA (C-FOLHAS, D-FRUTOS) DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

210

FIGURA 55- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DE *A.extraaxillaris* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO (F) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

212

FIGURA 56- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (F) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

213

FIGURA 57- EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (F) DE *C. argenteus* em laboratório. \*MEDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....

214

FIGURA 58- CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris*, NA REDUÇÃO DO DPPH. ....

227

FIGURA 59- CURVA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS FOLHAS DE *M. foetidus* NA REDUÇÃO DO DPPH.....

228

- FIGURA 60- CURVA EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE *M. foetidus* NA REDUÇÃO DO DPPH..... 229
- FIGURA 61- CURVA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DOS FRUTOS DE *M. foetidus* NA REDUÇÃO DO DPPH..... 229
- FIGURA 62- IC<sub>50</sub> DOS PADRÕES VITAMINA C (VC) E RUTINA (RU), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE DE *Asemeia extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus*. \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05)..... 230
- FIGURA 63- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS PADRÕES RUTINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *Asemeia extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus* EM RELAÇÃO AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.\*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05)..... 233
- FIGURA 64- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS PADRÕES RUTINA, BHT, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) De *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* EM RELAÇÃO AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA). \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05)..... 234
- FIGURA 65- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO BHT, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) De *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DO TIOCIANATO. \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05)..... 237

- FIGURA 66- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ÉTILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.\*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )...... 238
- FIGURA 67- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DE REDUÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE.\*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ). VC: VITAMINA C..... 240
- FIGURA 68- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ÉTILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE  $H_2O_2$ . \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ). VC: VITAMINA C..... 242
- FIGURA 69- RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O TIPO DE PREVENÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS..... 247
- FIGURA 70- ABERRAÇÕES INDUZIDAS PELO USO DO HERBICIDA ATRAZINA EM MERISTEMAS DE *A. cepa*. ANÁFASE NORMAL (A, B, C, E), ANÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA (D), METÁFASE COM ADERÊNCIA (F, G, H, I, K), CÉLULA POLINUCLEADA, PERTURBAÇÃO DO EIXO NA PRÓFASE RETARDADA..... 251
- FIGURA 71- EFEITO DA FAE DE *A. extraaxillaris* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $p < 0.05$ )...... 266
- FIGURA 72- EFEITO DA FAE DOS FRUTOS E EXTRATO HEXÂNICO DE *M. foetidus* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ )...... 267
- FIGURA 73- EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. FOETIDUS* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM

ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	267
FIGURA 74- EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> . MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	268
FIGURA 75- EFEITO DA FAE DE <i>A. extraaxillaris</i> NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> . MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	269
FIGURA 76- EFEITO DA FAE DE DOS FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> ) E EH DAS SEMENTES DE <i>M. foetidus</i> NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> . MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).....	270
FIGURA 77- LARVAS DE <i>A. aegypti</i> TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E FAE DOS FRUTOS DE <i>Microlobius foetidus</i> . CONTROLE DEMONSTRANDO O ASPECTO NORMAL DA LARVA NO 3º ESTÁDIO (A,B), LARVA NO 3º ESTÁDIO DEMONSTRANDO EXOESQUELETO FLEXÍVEL E DE FÁCIL ROMPIMENTO (C,D), ALONGAMENTO DA PARTE ANTERIOR AO TÓRAX (E, F) E ALONGAMENTO ENTRE O TÓRAX E A CÁPSULA CEFÁLICA (G,H).....	273
FIGURA 78 - LARVAS DE <i>A. aegypti</i> TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS OLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> . ONDE: A- CONTROLE; B, C- 25 µg.mL, D, E- 50 µg.mL, F, G E H- 100 µg.mL. *Nota= SE: EPITÉLIO SUBPERITRÓFICO, EE: EPITÉLIO ENDOPERITRÓFICO, PM: MEMBRANA PERITRÓFICA, IF:ALIMENTO INGERIDO, TE: TÓRAX EXTENDIDO. (40x, 900 µm).....	274
FIGURA 79- LARVAS DE <i>A. aegypti</i> TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E FAE DOS FRUTOS DE <i>Microlobius foetidus</i> . CONTROLE DEMONSTRANDO O ASPECTO NORMAL DA LARVA NO 3º ESTÁDIO (A), LARVA DEMONSTRANDO ATROFIA NO INTESTINO MÉDIO (B), ROMPIMENTO DO EPITÉLIO (C, E, F, G) E ESPESSAMENTO DA CAMADA PRIMÁRIA DO ENVELOPE EPITELIAL (D, H).....	275

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICAS <sup>1</sup> DO SOLO UTILIZADO NOS ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	889
TABELA 2 – TEOR DE UMIDADE DE <i>A. extraaxillaris</i> E DIFERENTES PARTES MORFOLÓGICAS DE <i>M. foetidus</i> .....	113
TABELA 3 – CINZAS TOTAIS PRESENTES EM <i>A. extraaxillaris</i> E DIFERENTES PARTES MORFOLÓGICAS DE <i>M. foetidus</i> .....	114
TABELA 4 – <sup>1</sup> DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE RMN 13C E RMN-1H DA SUBSTÂNCIA (2-HYDROXIFENIL)-ETANONA.....	115
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS OLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: HD (HIDRODESTILAÇÃO), SPME (MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA).....	119
TABELA 6 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	122
TABELA 7 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS DIFERENTES PARTES MORFOLÓGICAS DE <i>M. foetidus</i> .....	123
TABELA 8 – PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO DAS SEMENTES DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	125
TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	127
TABELA 10 – QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	128
TABELA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA <b>a1</b> E LITERATURA EM DMSO-d6.....	135
TABELA 12 – DEMONSTRATIVO DOS VALORES DE HIDROGÊNIO E CARBONO OBTIDOS PARA A SUBSTÂNCIA CATEQUINA E COMPARAÇÃO COM OS VALORES ENCONTRADOS NA LITERATURA (600MHz, MeOD).....	144

TABELA 13 – DEMONSTRATIVO DOS VALORES DE HIDROGÊNIO E CARBONO OBTIDOS PARA A SUBSTÂNCIA DIHIDROBINETINA (600MHz, MeOD).....	146
TABELA 14 – PARÂMETROS FITOSSOCIOLÓGICOS DE <i>B. decumbens</i> EM UMA ÁREA DE CERRADO PRÓXIMA À POPULAÇÃO DE <i>M. foetidus</i> .....	147
TABELA 15 – ÍNDICE MITÓTICO, DIFERENTES FASES DA DIVISÃO CELULAR E ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DAS RAÍZES DE <i>B. decumbens</i> , EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	159
TABELA 16 – FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DAS RAÍZES DE <i>I. cordifolia</i> , EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS DE <i>M. foetidus</i> DURANTE 24 HORAS.....	169
TABELA 17 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE <i>I. cordifolia</i> EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	178
TABELA 18 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE EMERGÊNCIA (%E) DE <i>I. cordifolia</i> EM EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	179
TABELA 19 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE <i>I. cordifolia</i> EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	186
TABELA 20 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE EMERGÊNCIA (%E) DE <i>I. cordifolia</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	186
TABELA 21 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA	



(FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (% G) DE <i>C. argenteus</i> EM LABORATÓRIO.....	195
--	-----

## TABELA 22 –

EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DA FOLHAS DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>C. argenteus</i> EM LABORATÓRIO.....	196
--	-----

TABELA 23 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DA CASCAS DE <i>M. FOETIDUS</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>C. argenteus</i> EM LABORATÓRIO.....	197
--	-----

TABELA 24 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DOS FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>C. argenteus</i> EM LABORATÓRIO.....	197
---	-----

TABELA 25 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS EMERSAS DE <i>C. argenteus</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	205
---	-----

TABELA 26 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS EMERSAS DE <i>C. argenteus</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	206
---	-----

TABELA 27 – ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA (IC <sub>50</sub> ) µg/mL <sup>-1</sup> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	217
--	-----

TABELA 28 – ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA (IC <sub>50</sub> ) µg/mL <sup>-1</sup> DO EXTRATO	
---	--

ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> .....	218
TABELA 29 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> , EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	221
TABELA 30 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> , EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	222
TABELA 31 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS DE <i>M.foetidus</i> , EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	223
TABELA 32 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) E ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS DE <i>Microlobius foetidus</i> , EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	223
TABELA 33 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS CASCAS DE <i>M. foetidus</i> , EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	224
TABELA 34 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS CASCAS DE <i>Microlobius foetidus</i> , EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	224
TABELA 35 – FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CELULARES EM	

MERISTEMAS DE <i>A. cepa</i> , SUBMETIDAS AO HERBICIDA ATRAZINA, E TRATADAS COM O PADRÃO QUERCETINA E A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DE <i>A. extraaxillaris</i> DURANTE 24 E 48 H DE RECUPERAÇÃO PÓS-TRATAMENTO.....	249
TABELA 36 – FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CELULARES EM MERISTEMAS DE <i>A. cepa</i> , SUBMETIDAS AO HERBICIDA ATRAZINA, E TRATADAS COM O PADRÃO QUERCETINA E A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>Microlobius foetidus</i> DURANTE 24 E 48 H DE RECUPERAÇÃO PÓS-TRATAMENTO.....	250
TABELA 37 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> NA MORTALIDADE E DL <sub>50</sub> DE <i>A. salina</i> EM LABORATÓRIO.....	255
TABELA 38 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS DE <i>M. foetidus</i> , NA MORTALIDADE E DL <sub>50</sub> DE <i>A. salina</i> .....	256
TABELA 39 – MORTALIDADE DE <i>Dugesia tigrina</i> SUBMETIDA ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	257
TABELA 40 – MORTALIDADE DE <i>Dugesia tigrina</i> SUBMETIDA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	258
TABELA 41 – REGENERAÇÃO DA REGIÃO CEFÁLICA DE <i>D. tigrina</i> EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO (FAE) E ETANOL- ÁGUA (FEA) DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	259
TABELA 42 – REGENERAÇÃO DA REGIÃO CEFÁLICA DE <i>D. tigrina</i> EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO (FAE) E ETANOL- ÁGUA (FEA) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> .....	260
TABELA 43 – TABELA 43-ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DE <i>A. extraaxillaris</i> .....	264

TABELA 44 – ATIVIDADE LARVICIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE <i>M.</i> <i>foetidus</i> .....	263
---	-----

## LISTA DE SIGLAS

AA – Atividade Antioxidante  
Abs – Absorbância  
Ache– Acetilcolinesterase  
APX– Superóxido dismutase  
ASC– Ascorbato Peroxidase  
ATCC – American Type Culture Collection  
BHT– Butil Hidroxi Tolueno  
C– Carbono  
CAT– Catalase  
CCD– Cromatografia de Camada Delgada  
CG – Cromatografia Gasosa  
CG–EM– Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas  
CH<sub>2</sub>– Grupo Metileno  
CH<sub>3</sub>– Grupo Metil  
CIM– Concentração Inibitória Mínima  
CLSI– Clinical and Laborator y Standarts Institute  
d– Dubleto  
D<sup>2</sup> – Diâmetro ao quadrado  
dd– duplo dubleto  
DEPT – Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer  
DMSO –Dimetilsulfóxido  
DMSO-d<sub>6</sub> -Dimetilsulfóxido deuterado  
EDTA-Na Etilenoaminotetracetato Tetrasódico  
EEB– Extrato Etanólico Bruto  
EH– Extrato Hexânico  
EC– Extrato clorofórmico  
EA– Extrato Acetato de etila  
EM– Extrato Metanólico  
*et al.*– E Colaboradores  
FAE– Fração Acetato de Etila

FCL– Fração Clorofórmio  
FH–Fração Hexânica  
FM–Fração Metanol  
GSH – Glutathione redutase  
IV– Infravermelho  
IVG –Índice de Velocidade de Germinação  
IVG –Índice de Velocidade de Germinação  
mDO–Mili Densidade Óptica  
MHz– Megahertz  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>–Sulfato de sódio  
NaCl– Cloreto de Sódio  
NaOH –Hidróxido de Sódio  
nm –Nanômetro  
pH–Potencial hidrogeniônico  
PM – Peso Molecular  
POD– Peroxidase  
POL– Polifenol oxidase  
PL– Peroxidação Lipídica  
ppm– Parte por milhão  
PR– Paraná  
RMN–<sup>13</sup>C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13  
RMN–<sup>1</sup>H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RPM– Rotações por Minuto  
s– Singleto  
SOD– Superóxido dismutase  
TMS– Tetrametilsilano  
TTC– Cloridrato de Trifenil Tetrazólio  
UFC– Unidades Formadoras de Colônia  
UI– Unidade Internacional  
UV– Ultravioleta  
W– Watts



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$ – Micrograma  
 $\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro  
 $\mu\text{L}$ – Microlitro  
BOD– Biological Organisms development  
 $^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius  
C– Carbono  
CH– Grupo Metínico  
 $\text{CH}_2$ – Grupo Metileno  
 $\text{CH}_3$ – Grupo Metil  
CIM– Concentração Inibitória Mínima  
CLM– Concentração Letal Mínima  
 $\text{CL}_{50}$ – Concentração letal média  
C-O– Carbonila  
 $\text{DL}_{50}$ – Dose letal média  
DPPH–1,1-difenil-2-picril-hidrazil  
 $\varepsilon$  – Coeficiente de correlação  
Hz– Hertz  
 $\text{IC}_{50}$  – Concentração inibitória média  
cm– Centímetro  
DMSO– Dimetilsulfóxido  
g– Grama  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$ – Ácido sulfúrico  
Hz– Hertz  
 $\text{IC}_{50}$  – Concentração inibitória média  
M– Molar  
mg– Miligramas  
 $\text{mg/mL}$ – Miligrama por mililitro  
 $\text{mg/mL}$ – Miligrama por litro  
mL– Mililitro  
mm – Milímetros

mm<sup>2</sup>– Milímetros quadrados

N– Normal

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de sódio

NaCl– Cloreto de Sódio

NaOH– Hidróxido de Sódio

NH<sub>4</sub>OH– Hidróxido de amônio

°C– Graus Celsius

pH– Potencial hidrogeniônico

v/v– Volume/volume

%– Por cento

<– Menor que

>– Maior que

M– Molar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	41
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>43</b>
3.1 BIOMA PANTANAL.....	43
3.2 FAMÍLIA POLYGALACEAE.....	45
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Asemeia</i> .....	46
3.4 <i>Asemeia extraaxilaris</i> (CHODAT) J. F. B. PASTORE & J. R. ABBOTT.....	47
3.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Microlobius</i> .....	50
3.6. <i>Microlobius foetidus</i> (Benth.) M. SOUSA ET G. ANDRADE (FABACEAE, MIMOSOIDEAE).....	50
3.7 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FLAVONOIDES.....	52
3.8 ALELOPATIA: CONCEITO E HISTÓRICO.....	54
3.9 DEFESA VEGETAL.....	56
3.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER.....	59
3.11 MECANISMOS DE AÇÃO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.....	60
3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	61
3.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	62
3.14 DETECÇÃO DE AGENTES TÓXICOS .....	67
3.15 ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae).....	70
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
4.1 ESCOLHA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	73
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	73
4.3 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	75
4.4 DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS.....	75
4.5 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS.....	75
4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	77
4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	77
4.8 TRANSESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS	

SEMENTES DE <i>Microlobius Foetidus</i> E ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	78
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Asemeia extraaxillaris</i> E <i>Microlobius foetidus</i> .....	79
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>A. extraaxillaris</i> E <i>M. foetidus</i> .....	79
4.11 ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>A. extraaxillaris</i> E FRUTOS DE <i>M. foetidus</i> .....	80
4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	82
4.12.1 OBSERVAÇÃO E COLETA DE DADOS SOBRE A INTERFERÊNCIA DE <i>Microlobius foetidus</i> SOBRE <i>Brachiaria decumbens</i> NO LOCAL DE COLETA.....	82
4.12.2 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>B. decumbens</i> PRÓXIMAS À <i>Microlobius foetidus</i> .....	83
4.12.3 ESCOLHA DAS ESPÉCIES- ALVO UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	86
4.13.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	86
4.12.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÈTODO DE DIFUSÃO EM ÀGAR EM LABORATÓRIO.....	87
4.12.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÈTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	88
4.12.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS EM LABORATÓRIO.....	90
4.12.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	92
4.12.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DAS PLANTAS COLETADAS EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	93
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.....	97
4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	98

4.15 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE <i>M. foetidus</i> e <i>A. extraaxillaris</i> POR MEIO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS.....	99
4.15.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL 2,2- DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA DPPH.....	100
4.15.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	101
4.15.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA).....	102
4.15.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TIOCIANATO.....	102
4.15. 5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MÉTODO TBARS-SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO).....	103
4.15.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE.....	104
4.15.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	104
4.15.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS DIFERENTES MÉTODOS EMPREGADOS.....	105
4.16 REDUÇÃO NO NÚMERO DE ABERRAÇÕES INDUZIDAS PELO HERBICIDA ATRAZINA.	106
4.17 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE A <i>Artemia salina</i> EM LABORATÓRIO.....	107
4.18 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À <i>Dugesia tigrina</i> EM LABORATÓRIO.....	108
4.19 4.19 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> .....	110
4.19.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i> .....	110
4.19.2 PREPARO DO HOMOGENEIZADO DE LARVAS DE <i>A. aegypti</i> SUBMETIDAS AOS ÓLEOS VOLÁTEIS, EXTRATOS E FRAÇÕES, DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TRIPSINA E QUIMIOTRIPSINA E	

ACETILCOLINESTERASE.....	111
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE.....	113
5.2 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	113
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS RAÍZES DE <i>A. extraaxillaris</i> E FOLHAS DE <i>M. foetidus</i> .....	114
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO E MICRO- EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	118
5.5 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>A. extraaxillaris</i> E <i>M. foetidus</i> .....	121
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE <i>Microlobius foetidus</i> .....	124
5.7 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Asemeia extraaxillaris</i> E <i>Microlobius foetidus</i> .....	125
<b>5.8 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....</b>	<b>130</b>
5.8.1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>a1</b> .....	130
5.8.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS <b>m1</b> E <b>m2</b> PRESENTES NA AMOSTRA <b>m35</b> .....	135
5.8.2.1 SUBSTÂNCIA <b>m1</b> .....	138
5.8.2.2 SUBSTÂNCIA <b>m2</b> .....	142
5.9 ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	146
5.9.1 INTERFERÊNCIA DE <i>Microlobius foetidus</i> SOBRE <i>Brachiaria decumbens</i> .....	146
5.9.2 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>B. decumbens</i> PRÓXIMAS À <i>Microlobius foetidus</i> .....	148
5.9.3 EFEITO ALELOPÁTICO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE <i>B. decumbens</i> .....	153
5.9.4 EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>A. extraaxillaris</i> SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>B. decumbens</i> .....	155
5.9.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS ÓLEOS	

VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> EM LABORATÓRIO.....	162
5.9.6 EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>M. foetidus</i> NO ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>I. cordifolia</i> E <i>B. decumbens</i> EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	171
5.9.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR EM LABORATÓRIO.....	177
5.9.8 EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	181
5.9.9 ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	185
5.9.10 EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	189
5.9.11 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES EM LABORATÓRIO.....	194
5.9.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EEB E FRAÇÕES EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	205
5.9.13 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DOS EEB E FRAÇÕES EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	211
5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.....	217
5.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	221
5.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	225
5.12.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL).....	225
5.12.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBÊNIO.....	232
5.12.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA).....	233
5.12.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TIOCIANATO.....	235
5.12.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	237
5.12.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO	

DA DESOXIRIBOSE.....	239
5.12.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	241
5.12.8 RELAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES MÉTODOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	243
5.13 REDUÇÕES NO NÚMERO DE ABERRAÇÕES PROVOCADOS PELO HERBICIDA ATRAZINA.....	248
5.14 ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À <i>A. salina</i> LEACH.....	254
5.15 ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À <i>Dugesia tigrina</i> .....	257
5.16 ATIVIDADE LARVICIDA.....	262
5.16.1 MORTALIDADE EM <i>A. aegypti</i> .....	262
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	277
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	279



## 1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais empregadas tanto para a alimentação da população humana quanto para fins medicinais, esteve presente ao longo do tempo (ALMASSY JUNIOR *et al.*, 2004). Esta opção terapêutica é a alternativa de uso para muitos brasileiros, principalmente em regiões com déficit da infraestrutura na área da saúde (LIMA *et al.*, 2007), que utilizam essa prática para si e para seus animais.

O conhecimento tradicional do uso das espécies medicinais é repassado, principalmente, de forma empírica entre indivíduos de uma mesma comunidade, sendo mantido por meio da tradição oral (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Porém, devido à necessidade de validação dos vários usos terapêuticos e consequentemente dos efeitos benéficos e maléficos causados pelo uso de plantas medicinais, nem sempre é aceita a forma de utilização popular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O resgate e a transmissão de conhecimentos acerca do uso adequado das espécies medicinais são de grande importância, pois muitas pessoas desconhecem os riscos dos efeitos colaterais e tóxicos, colocando em risco a sua saúde. Há de se ressaltar que muitas plantas úteis podem produzir substâncias potencialmente tóxicas, se utilizadas em dosagens inadequadas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Carlini (2004) afirma que, dentre os principais problemas causados pelo uso indiscriminado e prolongado de espécies medicinais, estão as reações alérgicas e os efeitos tóxicos em vários órgãos. Portanto, é de grande importância conscientizar a população sobre o uso adequado das plantas e medicamentos naturais.

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de fontes naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população (VEIGA- JUNIOR; PINTO, 2005).

A elucidação das substâncias ativas presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contém inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou

estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MACIEL *et al.*, 2002).

Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), ensaios bioquímicos visando alvos moleculares (enzimas e receptores) e cultura de células animais ou humanas. Contudo, o teste adequado dependerá da doença alvo.

Entre os períodos de 1981 a 2010 foram aprovadas cerca de 20 moléculas para uso farmacêutico, onde 50% são oriundas de síntese de moléculas obtidas a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Portanto, estudar a composição química é a condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos vegetais assume grande importância.

Além disso, as indústrias farmacêuticas nacionais e especialmente as internacionais, vem buscando nas plantas de cerrado essências, produtos e formulações para a produção de medicamentos, vacinas e outras formas de terapia, visando a industrialização e comercialização em larga escala de princípios ativos identificados em plantas.

Neste contexto, as espécies *Asemeia extraaxillaris* e *Microlobius foetidus* são alvos de estudo preliminar neste trabalho, segundo seus aspectos biológicos e fitoquímicos.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química de *Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J. F. B. Pastore & J. R. Abbott e *Microlobius foetidus* (Benth.) M. Sousa et G. Andrade e verificar suas atividades biológicas.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o rendimento do extrato etanólico bruto (EEB) extratos e frações hexânica (FH), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR) obtidos de *A. extraaxillaris* e diferentes partes morfológicas (folhas, cascas, frutos e sementes) de *M. foetidus* por meio de extração em Soxhlet.
- Identificar as substâncias presentes nos óleos voláteis das raízes de *A. extraaxillaris* e folhas de *M. foetidus*.
- Caracterizar os ácidos graxos presentes no extrato hexânico das sementes de *M. foetidus*.
- Avaliar o conteúdo de substâncias fenólicas e flavonoides dos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*.
- Isolar por métodos cromatográficos, os principais constituintes químicos presentes na fração acetato de etila de *A. extraaxillaris* e dos frutos de *M. foetidus*.
- Identificar os compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

- Avaliar a atividade alelopática dos óleos voláteis das raízes de *A. extraaxillaris* e folhas de *M. foetidus* em laboratório, bem como sua atividade citotóxica nas raízes e alterações no sistema de defesa antioxidante.
- Avaliar a atividade alelopática do pó das folhas e raízes, e dos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* em laboratório e casa de vegetação.
- Avaliar a redução de anormalidades cromossômicas em células de *Allium cepa*, induzidas pelo uso do herbicida atrazina e tratadas com os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*.
- Avaliar a atividade antineoplásica dos extratos e frações de *A. extraaxillaris*, Extrato etanólico bruto e fração acetato de etila de *M. foetidus* em células das linhagens U251 (glioma, SNC), MCF-7 (mama), OVCAR-3 (ovário), NCI-ADR/RES (ovário resistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), HT-29 (colon), HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada) e K562 (leucemia).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* sobre uma coleção de 12 micro-organismos sendo 8 bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei*, e 4 fungos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Cryptococcus neoformans*.
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* pelos métodos do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), complexo fosfomolibdênio, poder redutor (azul da Prússia), método do tiocianato, peroxidação lipídica, redução da desoxirribose e seqüestro do peróxido de hidrogênio.

- Avaliar a atividade tóxica dos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* pelos ensaios com *Artemia salina* e *Dugesia tigrina* em laboratório.
- Avaliar a atividade larvívica dos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*, e óleos voláteis de *M. foetidus*, sobre *Aedes aegypti* em laboratório.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOMA PANTANAL

Bioma é uma área do espaço geográfico caracterizada pela uniformidade de um macroclima definido, de uma determinada formação vegetal, de uma fauna e outros organismos vivos associados, e de outras condições ambientais, como o solo e alagamentos (COUTINHO, 2006). No mapa de biomas do Brasil o Pantanal foi considerado como o bioma de menor extensão, 1,76% da área total do Brasil (IBGE, 2004).

O bioma Pantanal compõe-se de um mosaico vegetacional onde se intercala formações savânicas lenhosas e campestres, formações florestais e vegetação aquática. Essa diversidade proporciona a ocorrência de grande número de nichos ecológicos de condições diversas, nos quais proliferam variados tipos de vegetação (FELFILI; CARVALHO; HAIDAR, 2005).

O Pantanal é considerado a maior planície inundável do mundo, localizado em região tropical, com temperatura média anual de 26°C, compreendendo os Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul no Centro-Oeste Brasileiro, com uma área de 140.000 km<sup>2</sup> e subdividido em 11 regiões (SILVA *et al.*, 1998): Porto Murtinho, Nabileque, Miranda, Aquidauana, Abobral, Nhecolândia, Paiaguás, Paraguai, Barão de Melgaço, Poconé e Cáceres (Figura 1).

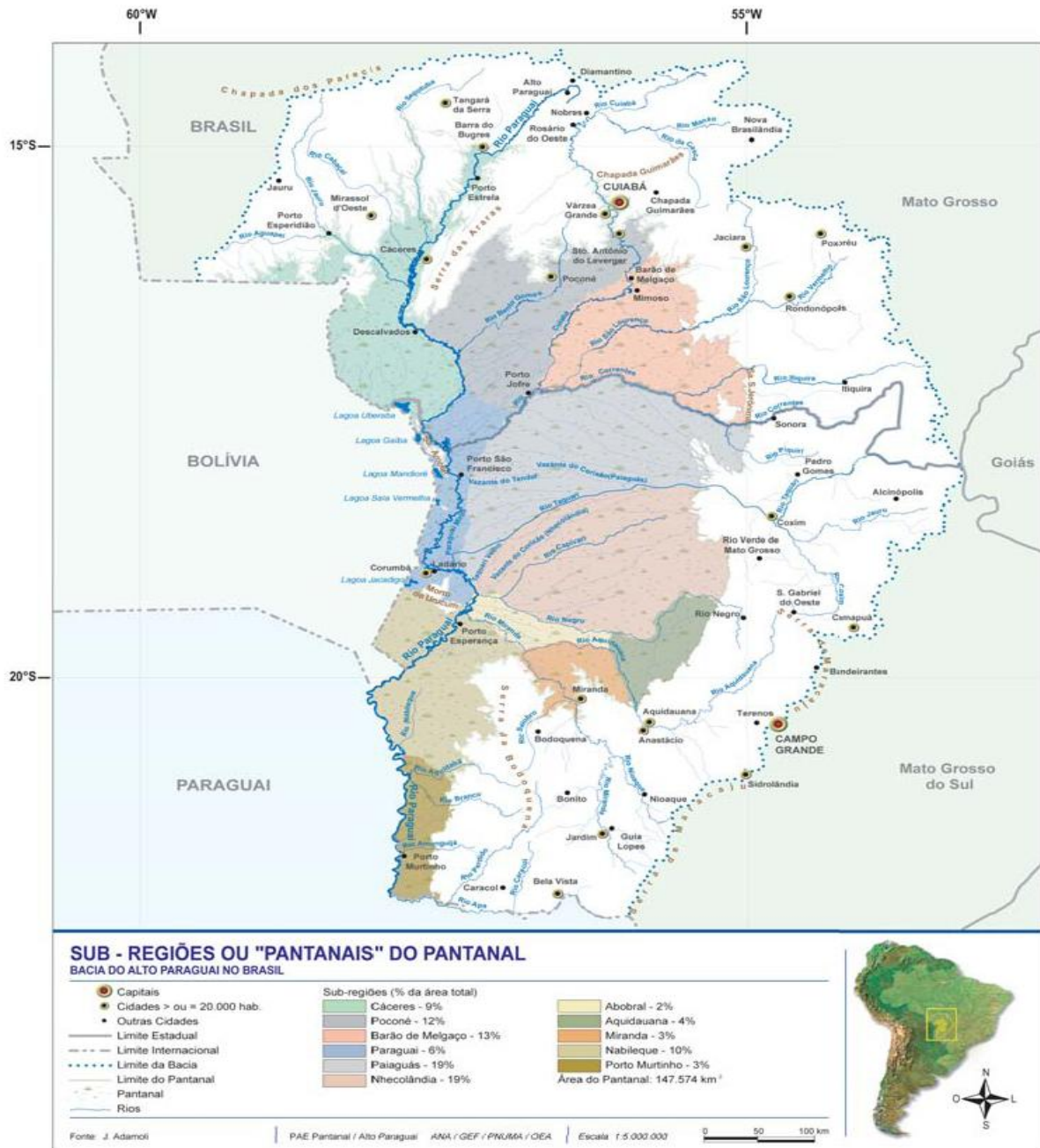


FIGURA 1. SUB-REGIÕES DO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL.  
FONTE: (ANA, 2013)

O Pantanal apresenta influência de quatro outros grandes biomas: Cerrado mais de (70% da área total), Floresta Amazônica aproximadamente (20%), Chaco (8 a 9%) e Florestas Meridionais (1%). A sua maior diferenciação em relação aos

outros biomas brasileiros é a presença de cheias periódicas (anuais e plurianuais), variáveis de local para local e de ano a ano, em função do volume de água e da duração. O regime hidrológico associado a elementos macroclimáticos e massas de ar, determinam a intensidade da cheia.

Esta inundação de água proveniente das chuvas e/ou do extravasamento dos rios, é decorrente da baixa declividade da planície (1 a 2 cm/km no sentido norte-sul e 10 a 20 cm/km de leste-oeste) e da baixa profundidade do lençol freático, com rápida saturação dos solos, proporcionando baixo escoamento das águas. A distribuição da vegetação do Pantanal está relacionada com a drenagem, fertilidade e nível do lençol freático. Essas variações determinam a grande quantidade de fitofisionomias do Pantanal (POTT *et al.*, 1997).

Para muitos que não conhecem o Pantanal, consideram-no como uma região uniforme e sem variações. No entanto, trata-se de uma região complexa, com grandes variações nos sistemas clima, solo, água, planta e animais. Em função das sub-regiões é um sistema dinâmico em constante mudança (RODRIGUES *et al.*, 2013).

### 3.2 FAMILIA POLYGALACEAE

O nome *Polygala* é uma união das palavras gregas *poly* (muito) e *gala* (leite), referenciando suas propriedades lactantes quando em infusão. Porém, as espécies atualmente pertencentes à família Polygalaceae não apresentam tal característica, visto que este nome foi inicialmente utilizado para designar a espécie atualmente conhecida como *Gallega officinallis* (Fabaceae) e, equivocadamente, foi empregado por botânicos do século XVI em uma espécie diferente, tendo este erro originado a família Polygalaceae (PASTORE, 2012).

A família é constituída por ervas, arbustos, pequenas árvores, trepadeiras e algumas saprófitas (FURNESS; STAFFORD, 1995), e dividida em quatro gêneros: *Asemeia*, *Moutabeae*, *Polygala* e *Xanthophylleae* (ERIKSEN, 1993) e engloba em

torno de 17 gêneros e mais de 1000 espécies, sendo aproximadamente metade destas pertencentes ao gênero *Asemeia*. É uma família quase cosmopolita, estando ausente apenas na Nova Zelândia e no círculo Ártico, encontrando-se presente principalmente em regiões de clima temperado e tropical.

A maior parte das espécies européias está restrita à região sul e mediterrânea, com apenas 10 espécies do gênero *Asemeia* na região norte do continente (FURNESS; STAFFORD, 1995). No Brasil, a família é representada por sete gêneros envolvendo 240 espécies em todas as formações vegetais (AGUIAR; ARANHA- FILHO, 2008).

Além das espécies pertencentes ao gênero *Asemeia*, diversas outras já demonstraram potencial farmacológico. Raízes de *Securidata longepedunculata* foram avaliadas, demonstrando atividades antinoceptivas, antidepressivas (ADEBIYI *et al.*, 2006), antimicrobianas (JUNAID *et al.*, 2008) e relaxante da musculatura lisa dos corpos cavernosos (MEYER; RAKUAMBO; HUSSEIN, 2008).

Dessa forma, destaca-se o grande interesse na família Polygalaceae, visto que sua importância medicinal ainda é economicamente pouco explorada, além do interesse taxonômico, com espécies de ocorrência em praticamente todas as formações vegetais, ideal para estudos comparativos (AGUIAR; ARANHA- FILHO, 2008).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Asemeia*

O gênero *Asemeia* possui aproximadamente 350 espécies, com ampla distribuição, especialmente nas áreas neotrópicas. Estima-se que este gênero seja aquele que possui um maior número de representantes no Brasil, com aproximadamente 110 espécies e 30 variedades. Geralmente apresentam-se como ervas ou arbustos, sendo árvores extremamente raras (WURDACK; SMITH, 1971).

O gênero *Asemeia* foi descrito anteriormente como *Polygala* por incluir vários grupos heterogêneos (CHODAT, 1889; BLAKE, 1916; PAIVA, 1998). No entanto, esta classificação, ou seja, *Polygala* não tem sido apoiado por dados filogenéticos



(PERSSON, 2001; FOREST *et al.* 2007). Estudos filogenéticos e a distinção morfológica do grupo conduziu à recente segregação deste gênero (PASTORE; ABBOTT, 2012).

Vários autores destacam as propriedades farmacológicas de espécies do gênero *Asemeia*, especialmente relacionados às suas potenciais atividades sobre o sistema nervoso central (SNC). Todavia, existem estudos que também demonstram atividade antinoceptiva e gastroprotetora. Meotti e Colaboradores (2006) verificaram que as frações diclorometano, acetato de etila e butanol e as substâncias dihidroestiril-2-pironas,  $\alpha$ -espinasterol, escopoletina e benzoescopoletina obtidas de *A. sabulosa* inibiram as contorções provocadas por ácido acético em camundongos.

O extrato hidroalcoólico também foi capaz de inibir a nocicepção induzida por glutamato. N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL- $\beta$ ) (RIBAS *et al.*, 2008).

LAPA *et al.* (2009) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *A. paniculata* teve ação inibitória sobre contorções abdominais induzidas por ácido acético sobre as duas fases do teste da formalina, bem como nocicepção induzida por etanol e por capsaicina, glutamato, NMDA, IL-1  $\beta$ , e cinamaldeído. Para a mesma espécie, foi evidenciado seu potencial gastroprotetor em modelos de úlcera induzida por etanol e por AINEs, sem alterar o volume e acidez da secreção gástrica (LAPA *et al.*, 2007). Além das espécies já citadas, diversas outras demonstraram atividade biológica, destacando a espécie *A. cyparissias* (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008).

### 3.4 *Asemeia extraaxilaris* (CHODAT) J. F. B. Pastore & J. R. Abbott

A espécie *Asemeia extraaxilaris* é descrita como um subarbusto 7-60 cm de altura, folhas lanceoladas a elípticas, base aguda, ápice agudo, margens planas, ciliadas, membranácea, com três nervuras principais saindo da base (AGUIAR *et al.*, 2008). As pétalas laterais rudimentares são muito estreitas (0,2 mm largura), com

mais da metade do seu comprimento aderido à bainha estaminal (LUDKE; AGUIAR, 2008).

A espécie ocorre no Paraguai, Argentina (MARQUES, 1979) e no Brasil, ocorre nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (Figura 2), sendo encontrada em beiras de estrada, em solos secos ou úmidos, em campos limpos arbustivos (AGUIAR *et al.*, 2008).

Não foram encontrados estudos sobre o perfil químico ou biológico de *Polygala extraaxilaris*, porém, estudos sobre o gênero têm mostrado a presença de diversos metabólitos secundários no gênero *Asemeia* tais como: saponinas, como a onjisaponina E isolada de *A. tenuifolia* (NAGAI *et al.*, 2001); oligossacarídeos esterificados como reiniose D, isolada das raízes de *A. fallax* (ZHANG *et al.*, 1997); flavonóides livres e heterosídicos como a ombuína-b-rutenosídeo isolada de *A. chinensis* (RAO; RAMAN, 2004); derivados livres e esterificados do ácido cinâmico, como o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, obtido a partir da espécie *A. tenuifolia* (KAWASHIMA *et al.*, 2004); cumarinas como a febalosina, isolada de *A. paniculata* (PIZZOLATTI *et al.*, 2002); xantonas, isoladas da espécie *A. cyparissias* (PINHEIRO *et al.*, 1998), entre outros. Testes farmacológicos realizados com espécies deste gênero como *A. cyparissias* relatam forte ação antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 1997) e *A. myrtifolia* apresenta expressiva atividade antimicrobiana, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (LALL; MEYER, 1999), e antifúngica, contra *Candida albicans* (MOTSEI *et al.*, 2003).

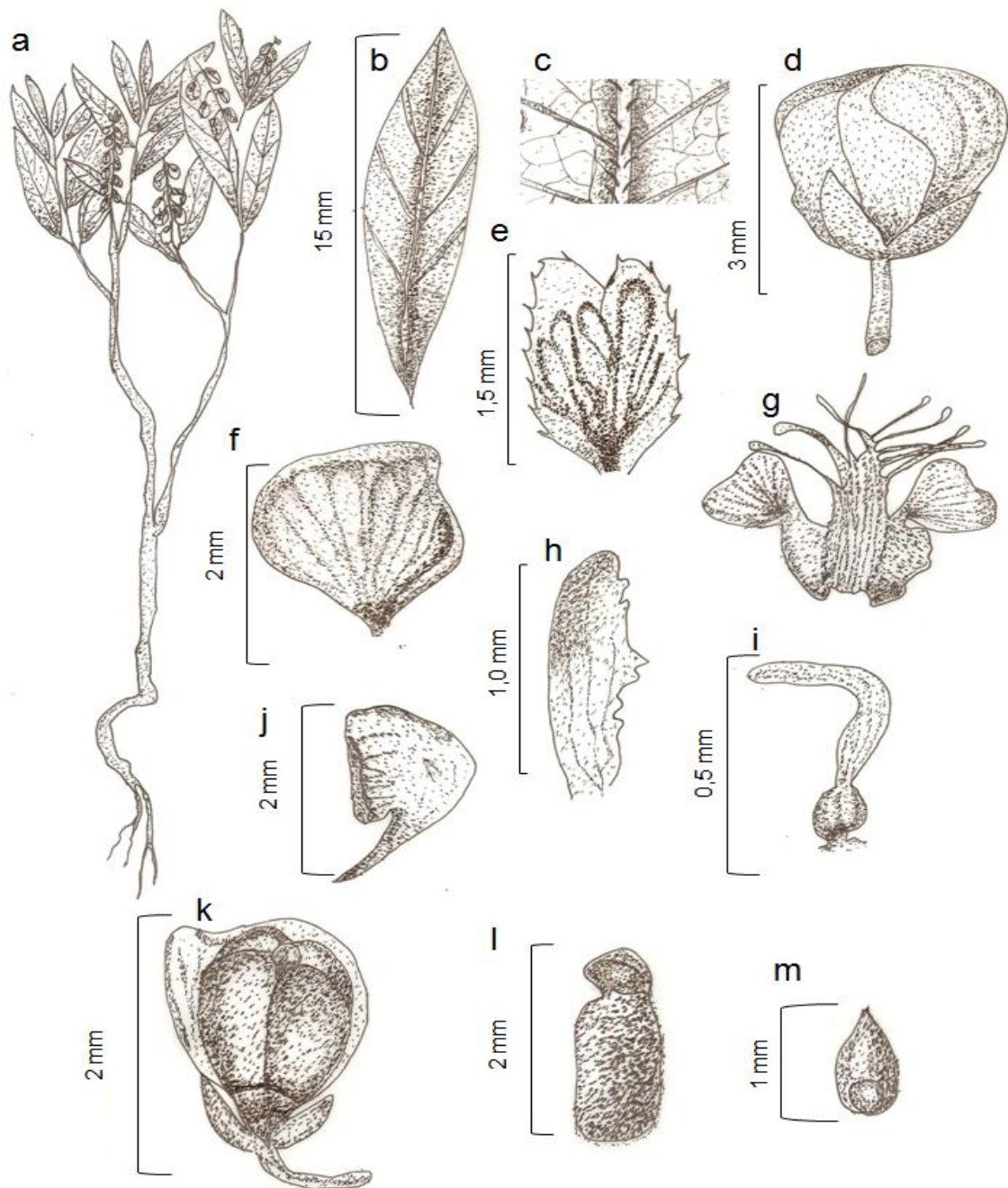


FIGURA 2. MORFOLOGIA EXTERNA DE *Asemeia extraaxillaris*. A) HÁBITO; B e C) LÂMINA FOLIAR; D) FLOR; E) SÉPALAS ABAXIAIS; F) SÉPALAS INTERNAS; G) PÉTALAS LATERAIS UNIDAS PELO DORSO ÀS MARGENS DA BAINHA DO ANDROCEU; H) SÉPALA ADAXIAL; I) GINECEU; J) CARENA; K) FRUTO COM O CÁLICE PERSISTENTE E ÊNFASE DA POSIÇÃO DE SUAS SEMENTES; M) SEMENTE; N) CORTE TRANSVERSAL DO TERÇO APICAL DO FRUTO.

FONTE: A AUTORA (2014).

### 3.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Microlobius*

O gênero *Microlobius* (sub família Mimosoideae) é representado apenas pela espécie *Microlobius foetidus*, com duas variedades: *foetidus* e *paraguensis*. A espécie foi excluída do gênero *Goldmania*, por possuir gineceu abortivo lignificado sobre as raques das inflorescências, que haviam sido descritos como frutos pequenos (SOUZA; ANDRADE, 1992). Ocorre desde o México até o Brasil, tendo ocorrência no pantanal, na divisa com a Bolívia e Paraguai (POTT; POTT, 1994; SOUZA; ANDRADE, 1992)

#### 3.6. *Microlobius foetidus* (Benth.) M. Sousa et G. Andrade (Fabaceae, Mimosoideae)

*Microlobius foetidus* (subsp. *paraguensis* (Benth.) M. Sousa et G. Andrade), conhecida popularmente como pau-alho, possui porte arbóreo com até 18 m de altura. Ocorre no Pantanal do Mato Grosso do Sul, em áreas alteradas (pastagens e beira de estradas), rebrotando com grande vigor após o corte raso e a queima. Devido ao forte aroma de alho, pode apresentar potencial para uso como repelente na agricultura e, como espécie pioneira, para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação da vegetação de áreas degradadas (POTT; POTT, 1994) (Figura 3). Não foram encontrados estudos sobre o perfil químico ou biológico desta espécie.

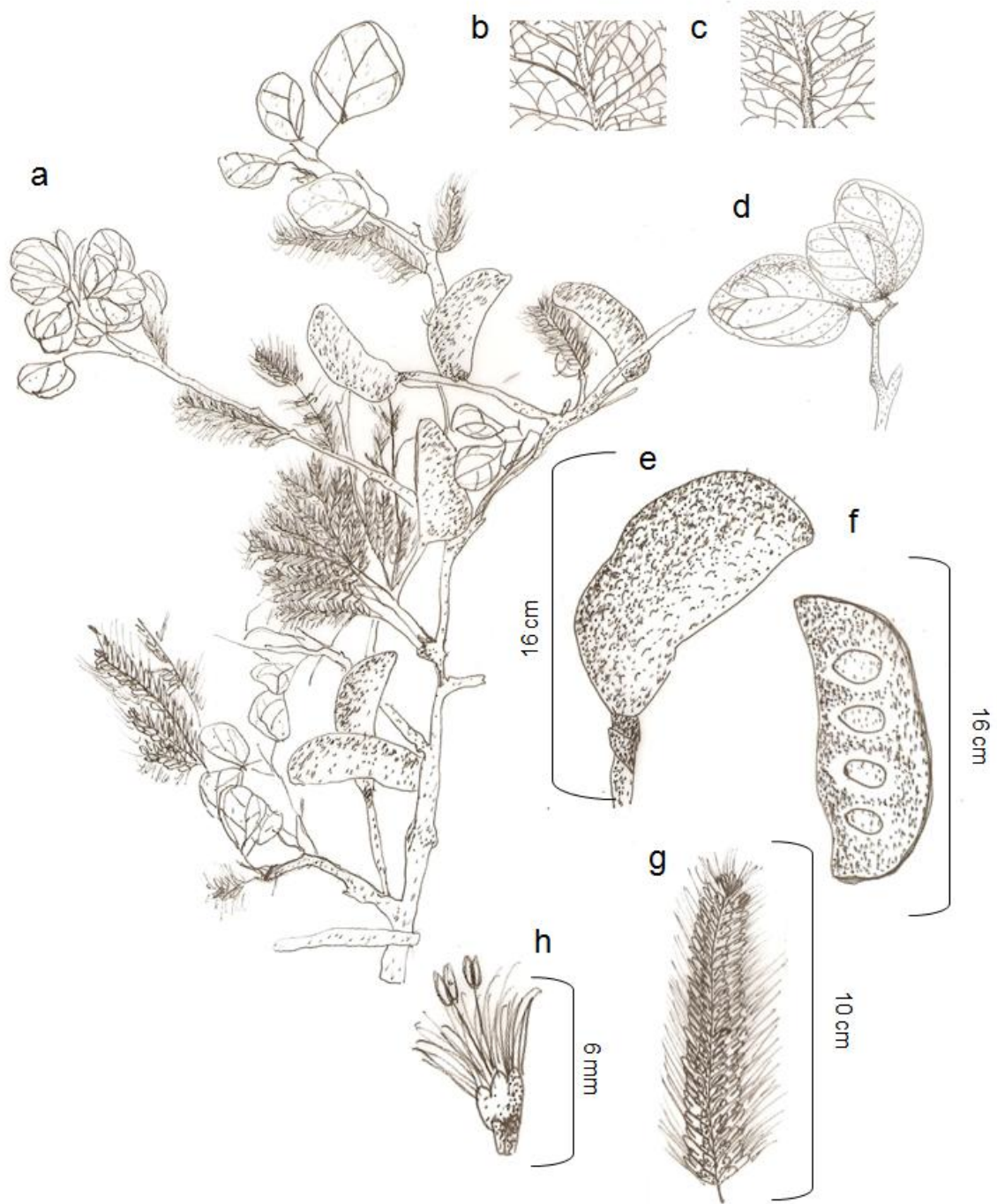


FIGURA 3. MORFOLOGIA EXTERNA DE *Microlobius foetidus*. A) HÁBITO; B) FACE ADAXIAL; C) FACE ABAXIAL; D) RAMO COM FOLHAS; E) FRUTO; F) CORTE LONGITUDINAL DO FRUTO; G) INFLORESCÊNCIA; H) FLOR.  
 FONTE: A AUTORA (2014).

### 3.7 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FLAVONOIDES

Sabe-se que ao longo dos anos a natureza evolui, sendo que neste contexto, uma variedade de metabólitos secundários é produzida, tendo relação com a defesa vegetal contra herbivoria, ou ainda por competição entre espécies (GANESAN, 2008).

Nesse contexto destaca-se a produção de flavonóides, que são por nós conhecidos como substâncias polifenólicas de baixo peso molecular, presentes com relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais e derivados do metabolismo da fenilalanina, pelas vias do ácido chiquímico e ácido acético (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Nos vegetais, os flavonoides desempenham alguns papéis importantes como a pigmentação de flores, com a finalidade de atrair polinizadores. A delfinidina fornece tons de lilás e azul, a cianidina fornece a cor magenta e o grupo das flavonas e flavonóis podem atuar como co-pigmentos. Estes ainda atuam na sobrevivência das plantas, como na proteção contra raios UV-B (pelo grupo das antocianidinas) e fornecem resistência contra invasão por patógenos (por exemplo, alguns isoflavonoides), tanto bactérias como fungos e vírus (pela baicaleína). Quando consideramos a interação planta-animal, os flavonoides podem proteger espécies vegetais contra insetos (como a rutina) e mamíferos (como as proantocianidinas) (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Quimicamente é possível encontrar flavonoides com diversas formas estruturais, mas sua estrutura fundamental é baseada no núcleo flavonoide que consiste em um núcleo com 15 átomos de carbono. Caracterizam-se por apresentar um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (figura 4). Os nomes triviais empregados para os flavonoides possuem, na maioria dos casos, relação à planta na qual foram identificados pela primeira vez. Em 2003, eram conhecidos cerca de 4.200 flavonoides diferentes, sendo que a maioria destas estruturas foi identificada no final de século XX e início do século XXI (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Devido ao grande número de flavonoides existentes, estes são agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas. Moléculas que são ligadas a um ou mais açúcares são denominadas de flavonoides glicosídicos,

enquanto moléculas não ligadas aos açúcares são denominadas agliconas. Com exceção da classe das catequinas, os flavonoides não ocorrem nas plantas como agliconas e sim, mais frequentemente, como derivados glicosídicos solúveis (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

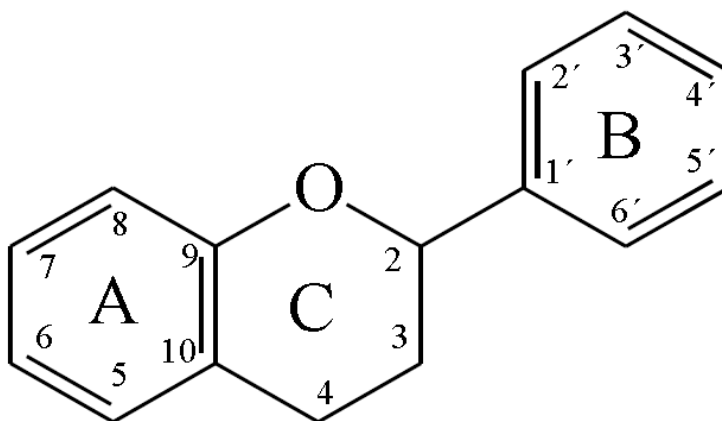


FIGURA 4 - ESTRUTURA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE  
 FONTE: SIMÕES, M.C.O., *ET AL.* (2000)

Nessa forma conjugada ou heterosídica, podem ser denominados C-heterosídeos, quando o açúcar se liga ao núcleo fundamental por um átomo de carbono, ou O-heterosídeos, quando a ligação se dá por meio de uma hidroxila.

Também são classificados de acordo com o nível de oxidação do seu anel —CII, o que os distribui como antocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas, entre outras classes. As classes mais numerosas são a das flavonas, a dos flavonóis e de seus O-heterosídeos, e a dos flavonoides C-heterosídeos. Possuem juntas aproximadamente 1.963 constituintes com estruturas conhecidas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

As flavonas e flavonóis diferem pela ausência ou presença de uma hidroxila no C-3. Entre os representantes mais conhecidos dessas classes estão a apigenina e a luteolina (flavonas), além da quercetina e do canferol (flavonóis) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Como são encontrados em produtos de origem vegetal, utilizados na alimentação humana como cebola, vinho, alface, cebolinhas, maçã, tomate, brócolis, laranja, cacau e chás, entre outros (AHERNE; O'BRIEN, 2002), os flavonóides despertaram interesse econômico, inicialmente decorrente de suas diferentes propriedades nas plantas e do seu valor nutricional (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Estudos mensurando as quantidades de canferol e quercetina em vegetais comestíveis crus revelaram quantidades abaixo de 10 mg/kg, exceto para cebola, brócolis, repolho e feijão que mostraram quantidades de até 486 mg/kg. Com relação às frutas, as quantidades de quercetina variaram em torno de 15 mg/kg, exceto para a maçã onde são encontrados entre 12 e 72 mg/kg (HERTOG *et al.*, 1992). Em função da dieta padrão, estima-se que as quantidades de flavonóides ingeridas diariamente por um indivíduo sejam de cerca de 100 miligramas (HOLLMAN; KATAN, 1999).

### 3.8 ALELOPATIA: CONCEITO E HISTÓRICO

A idéia de que uma planta pode influenciar no crescimento de outra, é bem conhecida na agricultura, sendo que o primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de plantas vizinhas foi descrito por Teophrastus (300 a.C.), um discípulo de Aristóteles, que observou que plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) não revigoravam o solo como outras plantas, ao contrário, o exauria e, ao mesmo tempo, destruía as plantas invasoras (RICE, 1984).

Plínio (1 d.C) reporta que grão-de-bico, cevada (*Hordeum vulgare* L.), ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) e a noqueira européia, (provavelmente *Juglans regia* L.), foram a causa de muitas preocupações para o homem e injúrias para as plantas da vizinhança. Deixou também registrada a observação que, sob a copa das plantas do gênero *Pinus*, o capim morria (RICE, 1984).

De Candolle em 1932, afirmava que o cansaço das terras decorrente da monocultura durante anos seguidos, era ocasionado pelo acúmulo de algumas



substâncias exsudadas pelas plantas a qual passava a afetar o próprio desenvolvimento (RICE, 1984).

Somente em 1937 o termo alelopatia foi cunhado pelo alemão Hans Molisch, significando do grego *allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo, para referir-se à interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas e inclusive entre micro-organismos (RICE, 1984). Muitos anos mais tarde RICE (1984) redefiniu o termo alelopatia como sendo “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microorganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Em 1996, foi criada a Sociedade Internacional de Alelopatia, que definiu-a como sendo a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos (MACIAS *et al.*, 2000).

Um ponto muito importante com relação a alelopatia é que os efeitos dependem dos compostos químicos adicionados ao ambiente, enquanto que, na “competição”, está envolvida a retirada ou redução de algum fator ambiental, que é requerido por uma planta do mesmo habitat, entre esses fatores podem ser incluídos a água, nutrientes, minerais e a luz (MEDEIROS, 1990).

O bioensaio mais utilizado em alelopatia é a germinação de sementes em placas de petri com papel filtro (LEATHER; EINHELLIG, 1986; MACIAS *et al.*, 2000), sendo recomendado para critério morfológico de germinação, como primeira abordagem, devendo ser seguido por testes de germinação em solo ou areia (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os testes de germinação, em geral, são menos sensíveis aos aleloquímicos do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, comprimento ou massa seca da raiz primária ou parte aérea. Porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o processo é discreto, germina ou não germina. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da raiz um dos sintomas mais comuns (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Alguns parâmetros como o pH e o volume de solução usado nos bioensaios devem ser levados em consideração visto que podem interferir na resposta

alelopática (LEATHER; EINHELLIG, 1986; FERREIRA; AQUILA, 2000; MACIAS *et al.*, 2000). MACIAS *et al.* (2000) recomendam o uso de pH 6,0 e um volume de solução de 0,2 mL por semente.

Há varias razões para o interesse do uso de compostos naturais como herbicidas, pois esses compostos são ambientalmente e toxicologicamente mais seguros que os herbicidas sintéticos apresentam uma diversidade de estruturas químicas que não são produzidas na química sintética e possuem sítios moleculares que não foram anteriormente explorados pelos herbicidas comerciais (DUKE *et al.*, 2001). Vários fatores podem influenciar a natureza alelopática de um composto químico, incluindo o modo de liberação e a ação bioativa. Em parte, porque a concentração, o tempo residente e o destino de um composto químico são bastante controlados pelos fatores do substrato (INDERJIT; DUKE, 2003).

O modelo de ação dos aleloquímicos pode, amplamente, ser dividido em ações diretas e indiretas. As ações indiretas podem incluir efeitos que promovem alterações nas propriedades do solo, sua situação nutricional, bem como, alterações na população e ou atividade de microorganismos, insetos, nematóides e outras. O modelo de ação direta envolve os efeitos dos aleloquímicos sobre vários aspectos do metabolismo e desenvolvimento das plantas (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

Alguns dos efeitos específicos incluem modificação na estrutura e no transporte das membranas, alterações das características da morfologia celular, interferência no ciclo celular (replicação, síntese de proteínas, mitose, mecanismos celulares), modificação da atividade de fitohormônios, perturbação do metabolismo energético (respiração e fotossíntese), problemas no balanço de água e na função dos estômatos, inibição de síntese de pigmentos e bloqueio da função de numerosas enzimas (EINHELLIG, 2002).

### 3.9 DEFESA VEGETAL

Muitos são os tipos de estresses que os vegetais podem enfrentar, como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou

patógenos, dentre outros. As plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares, como um mecanismo de resposta e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção. Para sobreviver, durante sua evolução, os vegetais desenvolveram mecanismos de resposta contra danos e doenças que, quando acionados, reconhecem a agressão. (SHEWRY; LUCAS, 1997; DE WIT, 2007).

Uma das principais revelações das pesquisas sobre defesa vegetal é que a resistência à patógenos é usualmente complexa e tem como base, a ação combinada de diversos fatores e não apenas um componente. Uma distinção fundamental é geralmente feita entre defesas pré-existentes ou constitutivas das plantas e sistemas induzidos por agressão. As defesas vegetais podem ser também classificadas como estruturais baseadas em características anatômicas, e químicas, quando relacionadas a compostos biologicamente ativos de massa molecular variada (SHEWRY; LUCAS, 1997).

A defesa estrutural é encontrada nas mais diversas partes da planta. A presença de pelos espinhos, tricomas e ceras recobrimdo principalmente a superfície de caules e frutos, são exemplos típicos dessas estruturas de defesa (BOWLES, 1990). Dentre as substâncias relacionadas a defesa química, destacam-se os alcalóides, fenóis, saponinas, lectinas, RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) quitinases, glucanases, flavonoides, inibidores de proteases e alérgenos (BOWLES, 1990; XAVIER-FILHO, 1993).

Em plantas, a produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) é favorecida por vários fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos (MALLICK; RAI, 1999).

Algumas EROS são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos, podendo alterar suas funções. O efeito final gerado depende não só do compartimento que está sendo afetado, mas do tipo de EROS que está reagindo (DROGE, 2002).

As EROS são formadas em etapas de redução univalente a partir do oxigênio molecular. O primeiro passo na redução de  $O_2$  produz radicais de vida relativamente curta, os superóxidos. Esses radicais de oxigênio não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

Os superóxidos formam hidroxiperoxidos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos), além de oxidar aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano. O superóxido também pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares. Posteriormente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que, apesar de não ser um radical livre, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de produção (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

A última e mais reativa espécie a ser formada nessa reação é o radical hidroxil (OH.). Esse radical é formado pela redução do  $H_2O_2$  por íons metálicos ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) na reação de Fenton e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. O hidroxil apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, seqüestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM *et al.*, 2001; NORDBERG; ARNER, 2001).

As plantas protegem suas células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das ERO com o auxílio de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO) e metabolitos, como a glutathione, ácido ascorbico,  $\alpha$ -tocoferol e carotenoides (SCANDALIOS, 1993; INZE; MONTAGU, 1995; MITTLER, 2002).

As enzimas antioxidantes contribuem na resposta de plantas ao estresse. Como exemplos pode-se citar que: (1) em *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco), a expressão da Cu/Zn-SOD é aumentada preferencialmente pelo choque térmico e congelamento (TSANG *et al.*, 1991); (2) nos tecidos infectados de plantas, uma redução da atividade da catalase levaria a um aumento de peróxido de hidrogênio, que poderia provocar a morte celular, que caracteriza a resposta de hipersensibilidade (HR), (MARGIS- PINHEIRO *et al.*, 1999).

### 3.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER

Câncer é um termo comum para todos os tumores malignos, derivado do termo latim caranguejo, câncer – porque um câncer agarra-se de maneira obstinada a qualquer parte daquilo que se apodera, como um caranguejo. Neoplasia significa “novo crescimento” e é então chamado de neoplasma (KUMAR *et al.*, 2005).

A definição de neoplasia mais aceita foi elaborada em 1930, pelo patologista Rupert Willis (COTRAN *et al.*, 1999) que a define como uma massa tumoral anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou.

Dessa forma, a célula cancerígena caracteriza-se pela perda da função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (SIEBER *et al.*, 2003).

Os tumores benignos são designados com a inclusão do sufixo *oma* na célula de origem, por exemplo, um tumor benigno que surge a partir das células fibroblásticas é denominado fibroma. Adenoma é o termo aplicado a um neoplasma epitelial benigno que forma padrões glandulares assim como tumores derivados de células de glândulas, mas não necessariamente reproduzindo os padrões glandulares. A nomenclatura dos tumores malignos segue o mesmo padrão usado para os neoplasmas benignos, com adição de algumas expressões (KUMAR *et al.*, 2005; VERWEIJ; JONGE, 2000).

Os tumores malignos que surgem do tecido mesenquimal são chamados de sarcomas. Os neoplasmas malignos, originados a partir de células epiteliais são chamados de carcinomas (KUMAR *et al.*, 2005). O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração no sistema de regulação da proliferação e da diferenciação celulares. Enquanto na maioria dos tecidos as células dividem-se de forma controlada, no câncer esse mecanismo de controle é perdido e ocorre uma proliferação celular acima das necessidades do tecido. O câncer pode ser

considerado uma doença genética cujo desenvolvimento se deve a mutações em determinados genes nucleares (JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

Uma mutação em um gene que modula a proliferação ou a diferenciação da célula pode fazer com que seu produto seja hiperativo ou produzido em excesso e, como resultado, tem-se a transformação do fenótipo celular. Esses genes mutantes são, por isso, classificados como oncogenes; ou seja, genes causadores de câncer. Os protooncogenes são genes normais expressos durante o desenvolvimento embrionário e mesmo em células maduras (RANG *et al.*, 2004).

Muitos deles codificam moléculas que induzem as células a se diferenciarem, receptores para essas moléculas, proteínas relacionadas a transdução de sinais e fatores de transcrição. Quando ocorrem mutações nos protooncogenes, com sua conseqüente hiperativação ou super-expressão, observamos o desenvolvimento de uma neoplasia (KUMAR *et al.*, 2005).

### 3.11 MECANISMOS DE AÇÃO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS

O processo básico da gênese de novas células, em que há alternância dos estágios de intérfase e de divisão das células é denominado de ciclo celular e é de fundamental importância seu conhecimento para entendimento do mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos e também para estudos relacionados ao câncer.

Os fármacos ideais para o tratamento do câncer deveriam erradicar as células cancerosas sem erradicar as células normais do paciente. O uso clínico dessas drogas exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, procurando um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2005).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre células que se encontram no ciclo celular, portanto, denominados de fármacos ciclo-específicos, entre eles citam-se: alcalóides da vinca, antimetabólitos, epipodofilotoxinas e taxanos. Um outro grupo denominado fármacos ciclo-não-específicos tem a capacidade de esterilizar as células tumorais, independente de estarem atravessando o ciclo ou em repouso. São exemplos de agentes ciclo-não-

específicos: agentes alquilantes, análogos da platina, antibióticos antitumorais, antraciclinas e campotecinas (KATZUNG, 2005).

Há uma ampla utilização clínica dos agentes antineoplásicos quimioterápicos que interagem com o DNA para as diversas neoplasias. Além do mais, em vários casos, a seletividade e eficiência destes agentes têm sido aumentadas por uso de mecanismos de liberação controlada e ou de cito-proteção (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Extensivas pesquisas realizadas a partir da metade do século passado com ingredientes ativos de frutas e vegetais têm identificado vários alvos moleculares que potencialmente poderão ser usadas, não apenas para a prevenção de câncer, mas também para seu tratamento. Dentre eles incluem-se: curcumina, resveratrol, genistein, eugenol, betacaroteno e limoneno (AGGARWAL *et al.*, 2006).

Outra contribuição para o aprimoramento da terapia do câncer é a utilização da farmacogenética que estuda a correlação entre as variações genéticas e a resposta aos fármacos. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) lançou um projeto há cerca de 8 anos que analisa a viabilidade do seqüenciamento completo dos genomas de todos os tipos de tumores. Assim, quando da identificação de genes, os seus produtos poderiam ser utilizados como alvos para a terapêutica, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo efeitos adversos (REIS, 2006).

### 3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Com o aumento de resistência microbiana aos medicamentos normalmente indicados para tratamento e controle de diversas infecções, medidas defensivas a serem tomadas incluem o controle do uso de antimicrobianos, pesquisas que ajudem a compreender os mecanismos de resistência (NASCIMENTO *et al.*, 2000), e a busca por novas drogas com ação antimicrobiana.

Produtos naturais de origem vegetal têm sido investigados por diversos pesquisadores em todo mundo, como uma estratégia para obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, drogas sintéticas ou naturais que

possam auxiliar ou controlar a disseminação desses micro- organismos (TAVARES, 2000; MIMS *et al.*, 1999; LIMA, 2001; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A vasta biodiversidade vegetal pode ser uma forma alternativa no combate as infecções microbianas (LOCHER, 1995). Contudo, os avanços nessa área tem esbarrado na carência de dados referentes a forma de uso, vias de administração, a ação biológica, composições químicas e controle de qualidade (VEGNIA *et al.*, 2004).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenoides e óleos essenciais (TORSSEL, 1989); alcaloides (FESSENDEN, 1982); lectinas e polipeptídios (TERRAS *et al.*, 1993; ZHANG; LEWIS, 1997) além de substâncias fenolicas e polifenóis, que são os fenóis simples, ácidos fenolicos, quinonas (STERN *et al.*, 1996), flavonas, flavonóis e flavonoides (FESSENDEN, 1982), taninos (SCALBERT, 1991) e cumarinas (O'KENNEDY; THORNES, 1997).

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de micro-organismos. Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

### 3. 13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são substâncias que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, podem ser definidos mais amplamente como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras



que oxidam um substrato), previnem significativamente sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

De acordo com SAITO *et al.*, (2004), os antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres para assim inibir a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas e os danos no DNA. Considerando que a atividade antioxidante de uma substância é influenciada pelo modelo de estudo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Costuma-se empregar mais de um tipo de ensaio, uma vez que estes podem direcionar para a atividade contra danos mais específicos, como peroxidação, redução da desoxirribose, entre outros. Dessa forma, antioxidantes podem atuar como agentes que retardam ou previnem lesões, sendo de interesse pela indústria alimentícia por prevenirem a rancidez resultante da oxidação de alimentos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário. Atribui-se à presença de compostos fenólicos, com destaque os flavonóides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Experimentos simples podem ser realizados para examinar diretamente a habilidade antioxidante *in vitro* e para testar possível efeito pró-oxidante em diferentes alvos moleculares. Um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil, conhecido como DDPH. Este ensaio permite determinar a porcentagem de atividade antioxidante que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo oxidante ou a atividade seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (SOUZA *et al.*, 2007).

O Método do DPPH é simples e amplamente empregado, onde o DPPH é um radical livre estável, não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxil, alcóxil e superóxido, que apresentam um importante papel nos processos oxidativos biológicos. Várias séries de compostos químicos tem apresentado estreita correlação entre as atividades

sequestradora de DPPH e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não-biológicos (MALTERUD *et al.* 1993).

Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste antioxidante que pode ser empregado para *screening* de compostos químicos sintéticos e produtos naturais, tornando-se importante como teste preliminar para a determinação do potencial antioxidante de um extrato e/ou fração, ou ainda substância pura.

A avaliação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênico determina a capacidade antioxidante total de uma amostra frente a uma reação de óxido-redução. Permite avaliar componentes tanto lipofílicos quanto hidrofílicos. Este ensaio fundamenta-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorrendo a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695nm (PRIETO; PINEDA; AGUIAR., 1999).

No teste do complexo fosfomolibdênio, os resultados obtidos podem indicar a atividade antioxidante, por reduzir o do molibdênio VI a molibdênio V, que por sua vez pode inibir a ação da xantina oxidase, pois o molibdênio é utilizado como co-fator desta enzima. A xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico que, em ambiente fisiológico, está na forma de urato. A hipoxantina e a xantina são muito mais solúveis que o ácido úrico, e este último pode se depositar como urato de sódio, um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença conhecida como gota (TSUTOMU *et al.* 1991).

Ensaio do poder redutor (azul da Prússia) é baseado na redução do  $\text{Fe}^{3+}$ , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o  $\text{Fe}^{3+}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido com  $\text{Fe}^{2+}$  (ROGINSKY; LISSI, 2005). O poder redutor é observado pela doação direta de elétrons na redução do ferricianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  a ferrocianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . O produto é visualizado pela adição de íons  $\text{Fe}^{3+}$ , que após a reação de redução, forma o complexo azul da prússia,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . O ensaio do poder redutor se torna importante na análise de substâncias, para fins de comparação com a

atividade do DPPH. A vantagem desse ensaio está no fato de que ensaios na atividade de frações menos solúveis como hexânica podem ter sua atividade determinada.

Os métodos que avaliam a peroxidação lipídica são importantes, uma vez que medem a ação de um radical livre sobre lipídios de membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

Na metodologia do tiocianato férrico, os peróxidos presentes oxidam o  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , o qual é doseado por colorimetria (500 nm) sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Neste ensaio, os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoléico reagem com o sulfato ferroso, dando origem ao sulfato férrico e, em seguida, ao tiocianato férrico, de cor vermelho sangue. Segundo Hua-Ming e Colaboradores (1996), o decréscimo da absorbância, revela a interrupção da oxidação em decorrência da não disponibilidade do ácido linoléico no meio da reação e surgimento de produtos secundários oriundos da degradação dos hidroperóxidos.

Um outro método importante na análise da peroxidação de lipídios é o teste do malonaldeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos agentes peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ , P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3- dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco ( $\text{pK}_a = 4,46$ ). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 515 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$ ). Se a formação de produtos derivados do MDA usualmente requer pH baixo e temperaturas elevadas (80-100°C), algumas substâncias fluorescentes derivadas do MDA podem ser geradas em pH neutro e temperatura mais baixa (37°C). Em pH neutro, a 37 °C, uma reação de condensação tipo Hantzsch entre o MDA e aminas primárias produz compostos fluorescentes. A reação não específica do MDA com grupos amino primários ocorre em várias

biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, aminas e fosfolípidos) produzindo complexos que são bases de Schiff conjugadas (JANERO, 1990).

A avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois muitas outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA. Esta inespecificidade é particularmente importante em lípideos contendo agentes autoxidados como produtos de decomposição secundária, incluindo complexa mistura de compostos saturados de cadeia curta (alcanos), insaturados (alcenos e alcadienos) e aldeídos monofuncionais, além de MDA. Alguns aldeídos monofuncionais também são reativos ao TBA, em meio ácido e à temperatura elevada utilizada no teste das SRATB, formando produtos derivados do TBA com um espectro no visível similar ao do complexo MDA:TBA (1:2) (JANERO, 1990).

Portanto, o teste espectrofotométrico com o TBA pode medir variedade de espécies que absorvem em 532 nm. Outra possível interferência neste método deve-se à presença de metais de transição, o que possibilita uma geração de MDA durante a análise. É essencial incluir-se quantidade suficiente de antioxidante para prevenir a autooxidação dos lípideos e a subsequente formação de MDA, durante a fase de aquecimento do ensaio. Adicionalmente, é aconselhável também tratar os reagentes com quelantes de metais de transição para impedir a interferência destes. Outra desvantagem do teste das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs) é a instabilidade do cromógeno, que absorve em 532 nm (FUKUNAGA; TAKAMA; SUZUKI; 1995).

Portanto, as condições do teste TBARs influenciam na análise da lipoperoxidação. Quatro fatores importantes devem ser considerados neste teste: (a) a influência das condições da reação e dos reagentes na resposta ao TBA; (b) a não especificidade do TBA para a reação com o MDA; (c) a não exclusividade do MDA como produto final da LPO (d) a impossibilidade de se distinguir o complexo MDA:TBA dos outros produtos reativos ao TBA por espectrofotometria (JANERO, 1990; BENZIE, 1996). Este método é de fácil utilização, fornecendo informações sobre a extensão da LPO em sistemas simples, *in vitro*, mas não é indicado para a análise em fluidos biológicos (ESTERBAUER *et al.*, 1984).

Outro método *in vitro* também utilizado para avaliar a atividade antioxidante é o ensaio da desoxirribose. Este açúcar é degradado quando exposto ao radical hidroxil, gerado por uma mistura que contenha  $\text{Fe}^{3+}$ , ascorbato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença

de uma pequena quantidade de EDTA. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, forma-se o malondialdeído, que pode ser detectado por sua habilidade em reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromógeno róseo. Qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com OH poderá competir com a desoxirribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e a formação de MDA. Este método mede a combinação de dois fatores: habilidade em remover íons ferro da desoxirribose e habilidade em tornar tais íons inativos ou pobremente ativos na geração de OH (HALLIWELL *et al.*, 1987).

### 3.14 DETECÇÃO DE AGENTES TÓXICOS

Os testes de toxicidade avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos aquáticos a um estímulo por estressor, que se manifesta geralmente num intervalo de 0 (zero) a 96 (noventa e seis) horas. O efeito normalmente observado é a mortalidade ou outra manifestação dos organismos que a anteceda, como imobilização, por exemplo (SOUZA, 2002).

Os bioensaios agudos objetivam determinar a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>), as quais mostram quais concentrações do agente tóxico utilizado causam mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste em até 96 horas após a exposição (BARROS *et al.*, 1993).

Os testes de toxicidade crônica dependem, diretamente, dos resultados obtidos a partir dos testes de toxicidade aguda, visto que as concentrações subletais utilizadas para tais bioensaios só podem ser calculadas a partir da CL<sub>50</sub>. Portanto, em comparação aos testes agudos, os crônicos são mais sensíveis a diluição esperada para as amostras ambientais (SVENSSON *et al.*, 2005).

Nos ambientes aquáticos, a ocorrência de efeitos crônicos é mais freqüente, como dito anteriormente, devido à diluição pontual dos agentes tóxicos oriundos dos efluentes e outras transformações químicas e físicas, resultando em exposição dos

organismos a baixas concentrações durante longos períodos de tempo, o que pode ocasionar efeitos crônicos a níveis subletais ou até mesmo letais com o passar do tempo (SAMPAIO *et al.*, 2004).

Para a escolha de organismos-teste em bioensaios toxicológicos para monitoramento do ambiente, geralmente utilizam-se alguns critérios de seleção das espécies. É importante que os organismos tenham sensibilidade relativamente constante e apurada a diversos agentes químicos, a fim de que se obtenham resultados mais precisos (SAMPAIO *et al.*, 2004).

Piontek (1998) afirmou que as planárias são organismos com grande potencial para testes ecotoxicológicos devido sua facilidade de cultivo e atividade regenerativa. São organismos sensíveis às variações ambientais, além de ser fauna integrante da maioria dos corpos d'água, podendo possivelmente ser utilizados para verificação da qualidade destes.

A espécie *Dugesia tigrina* Girard, pertence ao reino Animalia, filo Platyhelminthes, classe Turbellária. São organismos encontrados, geralmente, em ambientes aquáticos ou terrestres úmidos, podendo variar seu tamanho de 10 mm a 600 mm (SEITENFUS; LEAL-ZANCHET, 2004).

A espécie é carnívora e alimenta-se de pequenos invertebrados e corpos de animais mortos que chegam ao substrato. Possuem simetria bilateral e são acelomadas, não possuindo sistema circulatório nem respiratório, efetuando, assim, trocas gasosas por difusão simples, apresentando, por este motivo, a pele permeável e úmida.

A maioria é hermafrodita, podendo haver reprodução pelo processo de regeneração, por método clonal (fissão transversal ou longitudinal, em alguns casos) e brotamento, ou ainda sexualmente por fertilização cruzada e interna, a depender da população existente, e havendo produção de ovos com desenvolvimento direto (SEITENFUS; LEAL-ZANCHET, 2004).

Esses animais apresentam cefalização e possuem capacidade de regeneração completa e funcional do órgão do sistema nervoso central (SNC), correspondendo a dois cordões nervosos ventrais que acompanham longitudinalmente o corpo dos animais e se conectam em intervalos regulares por comissuras transversais, dando a impressão de um sistema nervoso segmentado (CEBRIA *et al.*, 2002).

Estes cordões agregam-se no interior do organismo para formar um gânglio cefálico, o qual processa as informações recebidas de estruturas sensoriais. Esta espécie apresenta um par de ocelos na região dorsal da cabeça, responsável pela percepção da Luminosidade e, também, quimiorreceptores para estímulos químicos, tais como olfato, e mecanorreceptores para estímulos mecânicos. Seu sistema digestivo é bastante simples, sendo composto apenas por boca e intestinos ramificados (SEITENFUS; LEAL-ZANCHET, 2004; INOUE *et al.*, 2004).

As planárias são organismos sensíveis, de fácil manutenção em laboratório, baixo custo e pela capacidade de regeneração, apresentando resultados em curtos períodos de tempo. Assim, os estudos que envolvem esses animais têm grande importância para a manutenção dos corpos aquáticos, já que contribuem com dados importantes sobre as respostas dos organismos aos compostos lançados nos recursos hídricos, servindo como base para a tomada de decisão e implantação de medidas que visem melhorar a qualidade ambiental e a conservação do meio ambiente.

*Artemia salina*, é uma larva de camarão de água salgada possui de 8 a 10 mm de comprimento e pertence à classe *Brachiopoda*, subclasse *Sasstraca* e ordem *Anostraca*. Nada sempre de dorso, com o ventre para cima, para a luz ou claridade do ambiente em que se encontra (telotaxia ventral) e em direção à luz (orientação fotopositiva). Muito prolífica, reproduz-se com bastante facilidade e rapidez. Seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante 10 anos, estando sempre aptos a eclodirem, desde que sejam colocados em água salgada (MCLAUGHIIN *et al.*, 1991).

*A. salina* tem grande importância na indústria de aquicultura e tem sido usada, como teste alternativo para determinar a toxicidade de produtos químicos e naturais (MCLAUGHIIN *et al.*, 1991; BARAHONA; SÁNCHEZ- FÓRTUN, 1996; PARRA *et al.*, 2001). O método é rápido, simples e barato e, sendo ideal para a seleção inicial de um grande número de amostras, detectando simultaneamente toxicidade e fototoxicidade, sendo utilizado como prognóstico para atividade antitumoral e pesticida (SÁNCHEZ *et al.*, 1993; OJALA *et al.*, 1999). A toxicidade de vários tipos de saponinas foi testada contra a *Artemia*, e a maioria delas não foi tóxica para o crustáceo em concentrações suficientemente altas (ZHAO *et al.*, 1999). Estudos comparativos dos efeitos de microcistinas e nodularina em *A. salina* mostraram que

estas toxinas elevaram os níveis de glutathione S-transferase para testes *in vivo* (BEATTIE *et al.*, 2003).

### 3.15 ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* (Culicidae)

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos que se tornou uma das principais preocupações na saúde pública, principalmente em regiões tropical e sub-tropical. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção, e 50 milhões de casos são registrados a cada ano em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Medidas de controle disponível para se evitar as infecções causadas pelo vírus da dengue é o combate ao seu principal vetor urbano, o mosquito *A. aegypti*, sendo a eliminação das larvas o método de controle ideal, uma vez que os mosquitos habitam locais abrigados e de difícil acesso (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995).

As estratégias utilizadas para controle das larvas e dos mosquitos *A. aegypti* são baseadas no uso de várias técnicas disponíveis, como o emprego do bioinseticida *bacillus thuringiensis* h-14 (bti), peixes larvófagos das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia sp* (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995) e dos inseticidas químicos das classes dos piretroides, carbamatos e organofosforados, além da melhoria de saneamento (LEFEVRE *et al.*, 2003). No entanto, o uso continuado de inseticidas sintéticos tem causado o problema de descontrole da população do mosquito, levando ao surgimento de espécies resistentes a uma grande variedade de inseticidas.

Esta estratégia também tem provocado outros efeitos indesejáveis, tais como poluição ambiental e toxicidade para seres humanos e outros organismos não-alvo (MACORIS *et al.*, 1999). Assim, torna-se necessária a busca de novas alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate à larva do *A. aegypti*. Uma das tendências atuais neste



sentido é ao estudo de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas.

Os organofosforados e carbamatos apresentam como mecanismo de ação a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. Estes pesticidas atuam no sítio esterásico, formando um complexo enzima-inibidor, cuja estabilidade está relacionada com a estrutura química do inseticida. Os organofosforados interagem no sítio ativo de modo irreversível, enquanto os carbamatos, por terem uma interação menos estável, atuam de modo reversível (CHARPENTIER; FOURNIER, 2001; STORM; ROZMAN; DOULL, 2000).

A acetilcolinesterase (AChE) tem como função hidrolisar a acetilcolina, formando ácido acético e colina. A acetilcolina é um mediador químico, responsável pela transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. Com a inibição da acetilcolinesterase aumenta o nível de acetilcolina nas sinapses, ocasionando paralisia e a morte do inseto (JOKANOVIC, 2001; PADILHA *et al.*, 1994).

Devido ao intenso uso de praguicidas, muitas espécies desenvolvem vários mecanismos de defesa para a sua sobrevivência, conseqüentemente, ocorre a redução da eficácia do produto devido à morte de todos os indivíduos suscetíveis, restando apenas os imunes ao produto (MACORIS *et al.*, 1999). O mosquito *Aedes aegypti*, cuja população se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais, apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (PAUL; HARRINGTON; SCOTT, 2006).

A necessidade de mudança periódica para atividade de controle desses insetos requer o uso de novos inseticidas ou substituição de métodos físicos e biológicos pelo maior tempo possível (JAMAL; HANSEN; JULU, 2002)

Neste contexto, a pesquisa sobre os recursos naturais e inseticidas biodegradáveis tem aumentado, visando minimizar impactos ambientais, onde encontrar novas substâncias que promovam a mortalidade das larvas e a impedir a criação das larvas resistentes devido à rotação de pesticidas. Alguns extratos de plantas têm atividade inseticida e esses potenciais fitoinseticidas podem ser alternativas mais seguras para o controle do mosquito, uma vez que se espera que

apresentam um elevado grau de biodegradação (PROMSIRI *et al.*, 2006; MURUGAN *et al.*, 2007;. RAHUMAN *et al.*, 2008).

A vantagem no uso de extratos de plantas contendo diferentes princípios ativos (metabolitos secundários, tais como, inibidores de tripsina, quimiotripsina e acetilcolinesterase) é que eles podem impedir o desenvolvimento da resistência larvar porque uma variedade de diferentes substâncias podem atuar em vários mecanismos de ação inseticida (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESCOLHA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Para a escolha das espécies utilizadas neste estudo, foram utilizadas duas abordagens diferentes: a espécie *M. foetidus* foi coletada conforme a abordagem randômica ou aleatória, que inclui a coleta de uma espécie vegetal, sem ser levado em conta seu uso, uma vez que indicações medicinais não foram citadas para esta espécie. A segunda metodologia envolveu a coleta da espécie *A. extraaxillaris*, com o uso da abordagem etnobotânica, ou seja, valoriza-se o elemento humano local, com seus conhecimentos desenvolvidos a partir da interação e convívio com a vegetação local e o ambiente, construindo uma série de elementos de saber tradicional que podem ser utilizados por outras populações, com o devido reconhecimento dos direitos de propriedade intelectual. Ambas as estratégias são válidas cientificamente e requerem, por suas diferentes concepções, metodologias subseqüentes diversas. A preparação dos extratos para o *screening* fitoquímico são processados e então investigadas as atividades biológicas.

### 4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As espécies *M. foetidus* e *A. extraaxillaris*, foram coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul, próximo à Região da Estrada Parque e Carandazal, sob as Coordenadas 19°29'16,20" S; 57°02'35,50" W e 19°33'97"S 057°02'20.7" W registrada sob nº 21739 e 22136, no herbário CGMS. Para confirmação das espécies, uma excisata de cada espécie foi encaminhada ao Museu botânico Municipal de Curitiba, e a espécies foram incorporadas, com número de identificação 334776 (*M. foetidus*) e 357010 (*A. extraaxillaris*). Todo o trabalho foi realizado de acordo com a Figura 5, sendo as metodologias descritas a seguir.

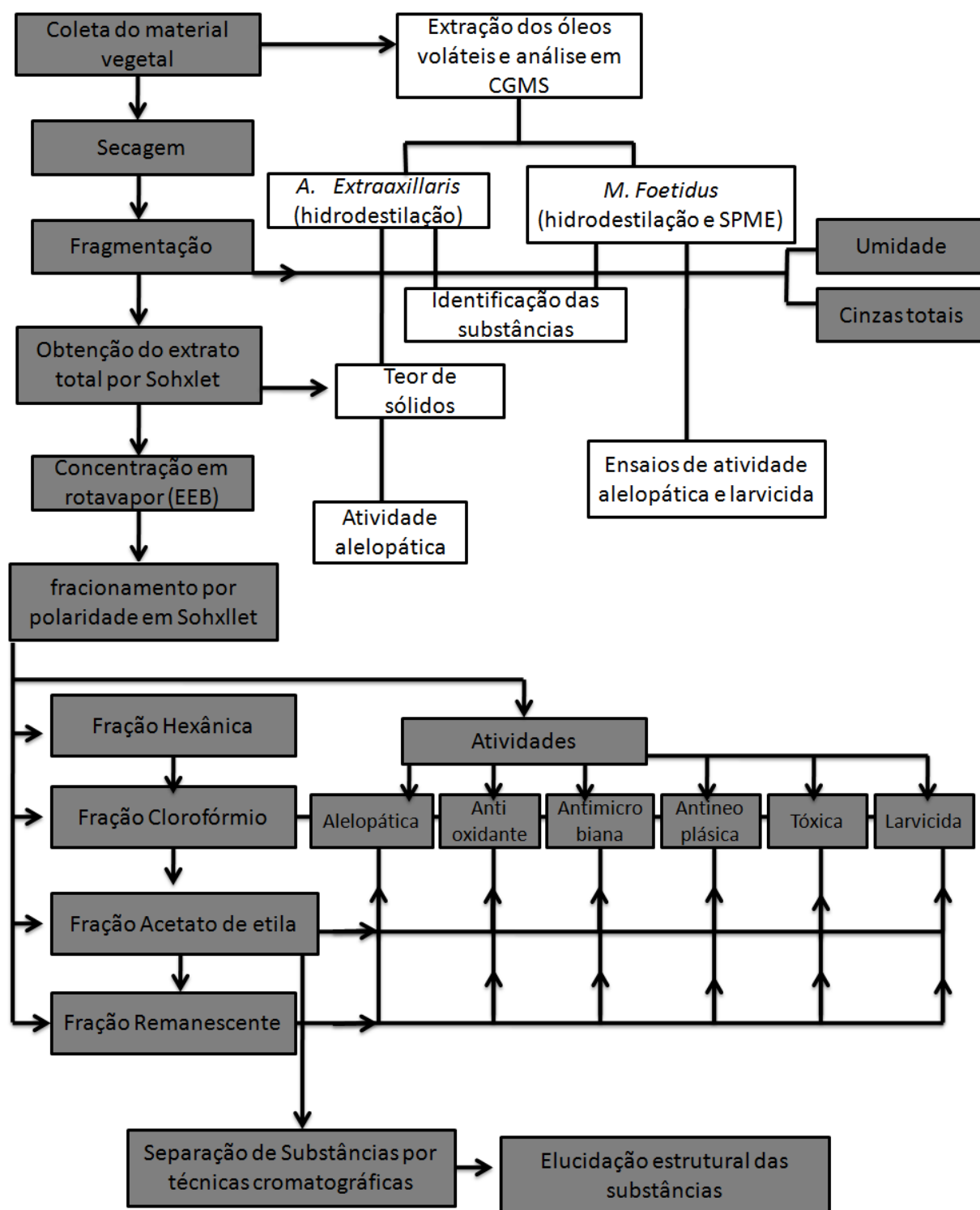


FIGURA 5. FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO PRESENTE TRABALHO.  
FONTE: A AUTORA (2013).

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

Neste parâmetro, foi utilizado o método gravimétrico da farmacopéia (2010) para determinação de umidade. Para cada espécie e partes morfológicas foram pesados 1,0 g. de material seco, previamente moído em moinho de facas e colocados em cadinhos de porcelana, previamente pesados. O material pesado foi seco em estufa a 100-105°C durante 3 horas e após o resfriamento em dessecador, foram novamente pesados, sendo este processo repetido até que o peso fosse constante não havendo diferença entre as duas ultimas pesagens (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS

Para determinação de cinzas totais, cadinhos utilizados na determinação de cinzas foram previamente calcinados em mufla a 450°C por 30 minutos e resfriado em dessecador. Após o resfriamento, o material vegetal foi novamente pesado (1 g) e levados para incineração em mufla 450°C por duas hora, e o material calcinado foi deixado em dessecador até temperatura ambiente e pesados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Após tais procedimentos, a porcentagem de cinzas em relação ao material seco foi determinada.

#### 4.5 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

Para a obtenção dos óleos voláteis, raízes de *A. extraaxillaris* e folhas de *M. foetidus*, foram submetidas à hidrodestilação por quatro horas em aparelho do tipo Clevenger, seguido pela extração exaustiva do destilado com hexano. A análise dos

óleos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa em um aparelho Varian CP-3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) [30m x 0,25mm, espessura do filme 0,2 ( $\mu\text{m}$ )], obtida da Phenomenex (Torrance, CA, USA). As condições de injeção foram: hidrogênio como gás carreador (1 mL/min); injetor split/splitless à 220° C; detector FID (detector de ionização em chama) à 280 °C; temperatura do forno de 50 °C à 250 °C com rampa de aquecimento de 4 °C/min.

As análises em CG-EM foram realizadas em um sistema Varian GC-MS-MS, equipado com um cromatógrafo gasoso Varian® – 3900, equipado com coluna capilar ZB-5, um injetor 1077, um injetor automático CP-8410, acoplado a um espectrômetro de massas Varian Saturn 2100, operando com impacto de elétrons de 70 e V, nas mesmas condições da análise em CG/FID.

A fim de comparar o perfil de substâncias identificadas por hidrodestilação nos óleos da folhas de *M. foetidus*, foi realizada uma extração por SPME (micro extração em fase sólida). A Fibra utilizada foi de NiTi-ZrO<sub>2</sub>-PDMS 35  $\mu\text{m}$ , sendo utilizados 100 mg de folha, com um tempo de 30 minutos de extração, e temperatura de extração a 40°C. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC 3900) acoplado ao espectrômetro de massas *ion-trap* (Saturn 2100), usando uma coluna capilar de sílica fundida, VF-5ms, com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$  e fase estacionária com 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano de baixo sangramento.

Os parâmetros cromatográficos utilizados na separação dos componentes foram: Temperatura do injetor: 250°C. Liner: *liner* para SPME *single goseneck* para injetor 1177 de 0,75mm. Gás de arraste: Hélio 99,999%. Vazão do gás de arraste na coluna: constante de 1,0 mLmin<sup>-1</sup>. Injeção (manual): "*splitless*" com tempo de amostragem de 1,0 minuto, seguido de uma razão de *split* de 50:1 por 15,0 minutos e de 20:1 no restante da corrida.

Programação de temperatura do forno da coluna: 50°C (isoterma de 2 minutos) e rampa de 50-250°C com aquecimento de 3°C.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do ion-trap, manifold e linha de transferência foram 200°C, 50°C e 250 °C, respectivamente. A energia de ionização empregada foi de 70 eV e aquisição com varredura de massas de 40 a 450 m.z<sup>-1</sup>.

A identificação dos componentes do óleo foi baseada em comparações dos tempos de retenções, pela determinação e comparação dos índices retenção de Kovats, e espectros de massas da biblioteca NBS/NIST com os índices descritos por Adams (1995). Uma série homóloga de n-alcenos ( $C_8$ - $C_{32}$ ) foi utilizada para o cálculo dos índices de retenção de Kovats.

A substância majoritária presente nos óleos voláteis de *A. extraaxillaris* foi confirmada por espectros de RMN ( $^1H$  e  $^{13}C$ ), obtidos em espectrômetro Bruker DPX-300. As amostras foram solubilizadas em  $CDCl_3$ , tomando-se como padrão interno de referência o TMS.

#### 4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

O material vegetal coletado foi seco em temperatura ambiente, moído em moinho de facas e submetido a maceração em aparelho soxhlet com ethanol 98%, e em seguida concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto. Uma quantidade de extrato foi submetida a fracionamento líquido- líquido em soxhlet, com solventes de diferentes graus de polaridade, obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR). Para a espécie *A. extraaxillaris*, obteve-se o extrato e frações da planta inteira. A espécie *M. foetidus* teve suas diferentes partes morfológicas fragmentadas, obtendo-se extratos e frações das folhas, cascas e frutos.

#### 4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE *M. foetidus*

As sementes de *M. foetidus* foram retiradas dos frutos, secas em temperatura ambiente e moídas em moinho de facas. O material moído foi extraído em aparelho soxhlet com 500 mL de álcool absoluto, até completa extração. Finalizada a

extração, o líquido obtido foi concentrado no aparelho soxhlet, até o volume de 12 mL e o líquido concentrado foi transferido para banho-maria a 60 °C, para finalizar a evaporação do solvente.

Após a extração com etanol, as sementes foram submetidas à extração com hexano, seguidos por clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se os extratos etanólico bruto (EEB) hexânico (EH), clorofórmico (ECL), acetato de etila (EAE) e metanólico (EM).

#### 4.8 TRANSESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE *M. foetidus* E ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A transesterificação dos ácidos graxos foi realizada conforme método 5509 ISO (1978). Aproximadamente 100 µL de óleo extraído do albúmen foi transferido para tubo de ensaio, adicionados 1,0 mL de hexano para solubilização do óleo com agitação. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de KOH 2 mol.L<sup>-1</sup> em metanol, e a mistura submetida à agitação vigorosa até a obtenção de separação das fases. Após a separação de fases, a superior foi transferida para frascos próprios e 2 µL foram injetados no cromatógrafo a gás.

Para análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos, um cromatógrafo a gás HP-5890 SÉREI II, equipado com software "N2000", com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida ZB-WAX (60 m, 0,25mm e 0,25 µm d. i. 100% etilenoglicol, Zebron, EUA) foi utilizado. A vazão dos gases foram de 1,2 mL.min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (N<sub>2</sub>), e para formação da chama 30 mL.min<sup>-1</sup> de gás H<sub>2</sub>, e 300 mL.min<sup>-1</sup> de ar sintético. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80. A programação da rampa foi de 140°C por 5.0 min.; seguidos com elevação de 5°C/min. até 200 °C por 12.0 min., e elevação de mais 5 °C/min. a 235 °C por mais 45 min. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos de uma mistura padrão contendo 37



compostos (Sigma-Aldrich)<sup>®</sup>. O percentual dos principais ácidos graxos existentes foi avaliado.

#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* E *M. foetidus*

Para a quantificação do teor de flavonoides, foi utilizada a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). Inicialmente foi preparada uma curva com soluções de quercetina nas concentrações de 5 a 50 µg.mL. A 400 µL das soluções de quercetina foram adicionados 200 µL de cloreto de alumínio a 2,5%, 200 µL de acetato de sódio 10% e 4 mL de etanol. A leitura foi realizada após 40 min. em espectrofotômetro a 425 nm. Para o branco foi utilizado etanol, cloreto de alumínio e o acetato de sódio. De posse dos valores de absorbância foi obtida a equação da reta. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para a avaliação dos extratos e frações, foi utilizada a concentração de 500 µg.mL, e em seguida os mesmos reagentes utilizados para a preparação da curva de calibração foram utilizados, para a reação, com exceção do padrão quercetina.

A leitura das absorbâncias foram lidas a 425 nm, e os resultados foram expressos em µg.mL de quercetina. Para cada amostra avaliada, foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

#### 4.10 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* E *M. foetidus*

O teor de fenóis totais dos extratos e frações foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu (MEDA *et al*, 2005; LIN; TANG, 2007). O ácido gálico foi utilizado como substância referência. Para a construção da curva padrão utilizou-se concentrações que variaram de 25 a 600 µg de ácido gálico. Para a determinação do teor de fenóis nas amostras, 5,0 mg de cada amostra, foi dissolvida em 5,0 mL de água destilada.

Posteriormente, alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram transferidas para balões de 50 mL, sendo acrescentado 30,0 mL de água destilada, 2,0 mL do reagente Folin Ciocalteu e após seis minutos 6,0 mL de uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 20%. Completou-se o volume do balão com água destilada. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, contendo todos os reagentes exceto as amostras do EEB e FS.

As soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente e após 1 hora e 30 minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Para cada amostra avaliada, foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

#### 4.11 ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *A. extraaxillaris* E FRUTOS DE *M. foetidus*

As frações acetato de etila de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* foram previamente analisadas através de cromatografia em camada delgada. Para estas análises, foram utilizadas cromatoplasas de sílica Sílica-gel 60 F254 Merck®. As amostras foram diluídas em metanol ou clorofórmio, de acordo com a sua solubilidade. Como fase móvel foi utilizada uma solução de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:26 v/v). As placas foram visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm, e quando necessário, reveladas com Neu (Difenilborato de amino- 2 etil) (NEU,1956).

A purificação das frações foi realizada através de cromatografia em coluna. Cada fração (600 mg para *A. extraaxillaris* e 468 mg para frutos de *M. foetidus*) foram incorporada a sílica-gel 60, para a formação da pastilha de sílica. Esta pastilha foi submetida à cromatografia em coluna, onde ocorreu a eluição das amostras através do sistema de passagem de solventes (hexano, acetato de etila e metanol) com gradientes de polaridades crescentes. Foram utilizados 100 mL de cada fase móvel, com uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> iniciando com hexano 100%, com acréscimo de 5% de clorofórmio (95:05 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de clorofórmio até 100% e acrescentando acetato de etila na ordem de 5% até a proporção de 100% e em seguida metanol 5% até a proporção de 100%. Ao final, água destilada 100% foi acrescida para limpeza da coluna. Foram recolhidos 190 frascos com aproximadamente 20 mL de eluato. O controle de eluição foi feito com lâmpada de luz UV a 360 nm.

As características das frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasas de Sílica-gel 60 F254 Merck®.

A cromatografia das frações acetato de etila (22,3 mg- *A. extraaxillaris* e 35,6 mg- *M. foetidus*/frutos), deu origem as substâncias denominadas **a1** (19,6 mg), para *A. extraaxillaris* e **m35** (14,8 mg) para *M. foetidus*.

A substância **a1** foi obtida a partir das subfrações 183- 185, que após a evaporação do solvente, apresentavam uma mistura de cristais amarelo- claros com impurezas. Os cristais foram lavados com metanol gelado para limpeza dos cristais e em seguida centrifugados a 4.000 rpm. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), os frascos foram reunidos.

As substâncias denominadas **m1** e **m2**, obtidas a partir da amostra **m35**, foram submetidas a cromatografia preparativa em placa de sílica gel com fase móvel acetato de etila, acetona e água (25:8:2). Após filtração com metanol preparou-se novamente uma CCD, na qual visualmente se observou a separação das substâncias.

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para determinação de sua estrutura. Os ensaios realizados foram espectroscopia de ressonância nuclear magnética de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, incluindo os experimentos bidimensionais HMBC e HSQC em aparelho Bruker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C a 200,12 e 50,56 MHz,

respectivamente. Os experimentos bidimensionais foram realizados em um equipamento Bruker® de 400MHz. Estes experimentos foram realizados no departamento de Química (UFPR).

#### 4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Para a determinação do potencial alelopático, foram verificados parâmetros iniciais na germinação e crescimento em laboratório. Após a determinação da atividade, os testes foram conduzidos com as espécies em casa de vegetação e determinado se o efeito alelopático aumentava ou não o estresse oxidativo nas plantas cultivadas em casa de vegetação.

##### 4.12.1 OBSERVAÇÃO E COLETA DE DADOS SOBRE A INTERFERÊNCIA DE *Microlobius foetidus* SOBRE *Brachiaria decumbens* NO LOCAL DE COLETA

Para verificar se a predominância da espécie *M. foetidus* afeta o estabelecimento de plantas daninhas, foi verificado se a espécie interfere na adaptação de *B. decumbens*. Este estudo foi realizado utilizando o método de parcelas, através de quadros com uma estrutura de ferro de 0,5m (BRANDÃO *et al.*, 1998; LARA *et al.* 2003). A área estudada se encontra em uma área de pastagem com cerca de 300 m<sup>2</sup>.

Para verificar a alteração no sistema de defesa antioxidante dos indivíduos amostrados, as parcelas foram montadas com diferenças de 0, 5, 10, 15 e 20 metros de distância da espécie *M. foetidus* no sentido norte-sul, com 10 parcelas para cada distância no sentido leste-oeste perfazendo no total, 50 parcelas. Cada área foi dividida por linhas perpendiculares, com uma distância de 5 metros entre as linhas, sendo as parcelas dispostas a cada 2 metros dentro de cada linha. Para avaliação

da cobertura de *B. decumbens*, bem como o mantilho (matéria orgânica morta) e solo descoberto, foi realizada a estimativa visual da porcentagem por unidade amostral.

A partir dos dados obtidos, foram calculados os seguintes parâmetros fitossociológicos: cobertura absoluta (CA), frequência absoluta (FA), cobertura relativa (CR), frequência relativa (FR) e Valor de importância (VI) (BRANDÃO *et al.*, 1998; LARA *et al.* 2003).

Após a tomada de dados, cerca de 5 indivíduos de cada parcela foram coletados, identificados e acondicionados em caixa de isopor com gelo, e em seguida, levados ao laboratório, para avaliar se há ou não alterações no sistema antioxidante das espécies coletadas.

#### 4.12.2 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE *B. decumbens* PRÓXIMAS À *Microlobius foetidus*

Para o preparo do extrato enzimático, cerca de 50 mg de amostras de cada parcela foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, e o pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 1,0%. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES; XAVIER 1991). Os extratos foram acondicionados a -18°C até o momento da análise. As preparações para a extração das enzimas foram realizadas a 4 °C.

A quantidade total de proteínas presentes nas espécies avaliadas foi realizada através da preparação do reagente em laboratório. A concentração da proteína nos extratos foi determinada por comparação com uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA), e a atividade determinada por espectrofotometria a 594 nm (BRADFORD, 1976).

A atividade da catalase foi medida em um meio contendo 67 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato

enzimático. O consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi monitorado a 240 nm ( $\epsilon$ ,  $0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (AEBI 1984).

A atividade da peroxidase (POD) foi medida em um meio contendo tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) guaiacol (2,6 mM) e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A formação de Tetraguaicol ( $\epsilon$ ,  $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi monitorada a 470 nm (PUTTER 1974).

Atividade de superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). O meio continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) e L- metionina 6,5 mM, NBT (nitroblue tetrazolium) 150  $\mu\text{M}$ , riboflavina 4  $\mu\text{M}$  e 0,02-0,1 mg de proteína do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela ativação de uma luz (20 W) e iluminando o meio durante 20 minutos a 30 °C. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50% da taxa de fotoredução (NBT) a 560 nm, e os resultados foram expressos como unidades de SOD.  $\mu\text{g. proteína}^{-1}$ .

A atividade da glutathione redutase foi medida num meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, dissulfeto de glutathione 0,5 mM, NADPH 0,15 mM, e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A taxa de oxidação do NADPH foi monitorada a 340 nm ( $\epsilon$   $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (FOYER; HALLIWELL 1976).

A peroxidação lipídica foi medida num meio contendo 0,1% de ácido tricloroacético, 0,5% de ácido tiobarbitúrico e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático (GOMES-JÚNIOR *et al.* 2006). A absorbância foi lida a 534 nm e a atividade expressa como percentagem do estímulo de peroxidação lipídica.

A extração e a análise da concentração foliar de carboidratos solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga e Colaboradores (2006), utilizando-se o método fenol sulfúrico. As folhas de cada amostra, previamente armazenadas tiveram a nervura central retirada e foram maceradas com nitrogênio líquido. Após maceradas, foi retirada 300 mg de massa seca, e colocados em tubo de ensaio, e adicionados 3mL de etanol 80%. Posteriormente a mistura foi agitada por 30 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60°C, sendo novamente agitada manualmente durante 30 segundos, e centrifugada numa temperatura de 4°C a 4000 rpm, por 30 minutos.

Após a centrifugação, 1,0 mL das fases líquidas foram transferidas para tubos de ensaio, e adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio seguido por 1,0 mL de água deionizada, e a mistura permaneceu em repouso por 45 minutos, obtendo-se a separação de fases, com os pigmentos no fundo do tubo e os carboidratos dissolvidos na parte aquosa superior. Cerca de 200 µL da fase aquosa obtida foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 1,0 mL de água deionizada. Desta solução, foram retirados 500 µL e transferidos para tubos de ensaio, contendo 500 µL de fenol (5%) e 25 µL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida a mistura foi agitada em vortex realizada a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 485 nm. Para obtenção dos valores de concentração de carboidratos solúveis totais utilizou-se a curva de calibração:  $y = 0,0081x + 0,0744$  (onde:  $y$ =absorbância;  $x$ =concentração de carboidratos;  $R^2 = 0,9988$ ).

Para a determinação do conteúdo de prolina, 1,0 mL de solução das amostras receberam 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente, e em seguida 1,0 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de ensaio e adicionados 1,0 mL de ninidrina ácida seguido de 1,0 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria por 1h a 100°C e após esse período as amostras foram resfriadas em gelo, sendo adicionadas em seguida 2,0 mL de tolueno e agitado vigorosamente em vortex, por 30 segundos, para separação das fases (o tolueno extrai a substância cromófora formando um complexo colorido avermelhado). Após a solução atingir a temperatura ambiente, aspirou-se a fase superior (cromóforo + tolueno), para leitura em espectrofotômetro a 520 nm, conforme descrito por Bates e Colaboradores (1973). Para obtenção dos valores de concentração de prolina utilizou-se a curva de calibração:  $y = 0,0959x - 0,2147$  (onde:  $y$ =absorbância;  $x$ =concentração de prolina;  $R^2 = 0,9926$ ).

Para cada amostra avaliada, foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade. Quando uma das pressuposições exigidas pelo modelo paramétrico não foi atendida, utilizaram-se os testes estatísticos não-paramétricos, Kruskal-Wallis como alternativa para a análise de variância e Mann-Whitney como alternativa para o teste de Dunnet.

#### 4.12.3 ESCOLHA DAS ESPÉCIES- ALVO UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

As espécies-alvo utilizadas nos ensaios de atividade alelopática foram *Brachiaria decumbens* (Poaceae), *Ipomoea cordifolia* (Convolvulaceae) e *Croton argenteus* (Euphorbiaceae). Tais espécies foram escolhidas por ocorrerem no Pantanal e nos locais onde as espécies estudadas (*A. extraaxillaris* e *M. foetidus*) se desenvolvem, com a finalidade de estabelecer se os efeitos observados em campo são reproduzidos em laboratório. As espécies *B. decumbens* e *I. cordifolia* foram adquiridas pela empresa agrocósmos, e as sementes da espécie *C. argenteus* foi coletada juntamente com o material vegetal de *M. foetidus*.

#### 4.13.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO

Para o preparo das soluções os extratos voláteis foram emulsionados com Tween 80, na proporção 1:1 (v/v) e dissolvido em água destilada para a obtenção da solução estoque na concentração de 1%. As demais concentrações (0,5, 0,25, 0,12 e 0,05%) foram preparadas por diluição. Como controle, foi utilizado uma solução de Tween 80 a 1,0% v/v (ALVES *et al.*, 2004).

Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº 1,0, receberam 5,0 mL de água destilada. Em seguida foram semeados aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos das espécies-alvo (*B. decumbens* e *I. cordifolia*) distribuídas aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução conforme BRASIL, (2009). Após a semeadura, 3,0 ml da solução de cada concentração dos óleos voláteis foram distribuídos em dois papéis-filtro, colados na tampa da placa, evitando o contato direto com as sementes (ALVES *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2009a). Como



controle procedimento similar foi utilizado, porém com ausência das soluções contendo os óleos voláteis.

As placas de Petri contendo os diásporos foram fechadas e envolvidas com filme plástico e levadas a uma câmara de germinação, com condições de luz, umidade e temperatura constantes, adequadas a espécie alvo (35°C para *B. decumbens* e 30°C para *I. cordifolia*), conforme Brasil (2009). Após cinco dias de incubação, foi determinada a porcentagem de germinação, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento.

Para os bioensaios de crescimento, foi utilizada a mesma metodologia já descrita anteriormente. Após sete dias, as plântulas foram retiradas e congeladas para a determinação do crescimento da raiz primária, hipocótilo/mesocótilo e massa seca, conforme MACIAS (2000).

#### 4.12.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR EM LABORATÓRIO

Para verificar se o efeito alelopático das espécies *A. extraaxillaris* (folhas e raízes) e *M. foetidus* (folhas, cascas, frutos e sementes) ocorrem em função da lixiviação de substâncias dessas espécies, foi utilizado o método de difusão do pó destas plantas em Ágar. As plantas coletadas nas áreas já descritas foram secas em temperatura ambiente, moída em moinho de facas e armazenadas até sua utilização (FUJJI *et al.*, 2004).

Solução de Ágar (0,5%) foi preparada e autoclavada durante 15 minutos a 115 °C. Para os bioensaios, 5 mL da solução de ágar foi adicionada em placas (10 cm<sup>2</sup>), e posteriormente adicionou-se 10, 25 e 50 mg de matéria seca de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*, com quatro repetições em cada tratamento. Em seguida, adicionou-se 5 mL de ágar na parte superior da primeira camada. Semeou-se aleatoriamente 30 sementes de *I. cordifolia* em cada placa as quais foram levadas a uma câmara de germinação em condições de umidade e temperatura (20 °C) constante e sem luminosidade (FUJJI *et al.*, 2004).

Após cinco dias, foi avaliada a porcentagem de sementes germinados. A avaliação da germinação foi realizada conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), contabilizando-se como plântulas normais todas que possuíam as estruturas essenciais do embrião desenvolvidas e com no mínimo 2 mm de comprimento de radícula. Foi medido o alongamento da raiz e do hipocótilo (dez plântulas por placa) utilizando-se papel milimetrado.

Para cada espécie avaliada o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado envolvendo 2 espécies de plantas daninhas com quatro tratamentos (0, 10, 25 e 50 mg), em quatro repetições. A unidade experimental constitui-se de 30 sementes para germinação e dez para o crescimento da raiz e hipocótilo. A germinabilidade (%G) foi calculada segundo a metodologia descrita por Labouriau (1983). Os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença pelo teste F, as médias foram testadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

#### 4.12.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Nos ensaios em casa de vegetação, o pó moído das folhas e raízes de *A. extraaxillaris* e folhas, cascas, frutos e sementes de *M. foetidus* foram avaliados de maneira semelhante à metodologia empregada em laboratório. Para o ensaio as concentrações de 50, 25 e 10 mg.g<sup>-1</sup> foram pesadas e misturadas ao solo, adquirido comercialmente. O solo foi submetido análises físico- químicas, realizadas no laboratório de solos da UFGD e os resultados se encontram na tabela 1, e os parâmetros indicadores da qualidade do solo mostram que este apresenta condições adequadas para o uso.

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICAS<sup>1</sup> DO SOLO UTILIZADO NOS ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

	Argila	MO	pH	P	K	S	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
	g Kg <sup>-1</sup>		CaCl <sub>2</sub>		mg dm <sup>-3</sup>		C mol dm <sup>-3</sup>	
Média	461,2	20,3	4,8	7,4	36,5	12,7	1,6	0,7
Máximo	587	25,4	4,9	15,4	55,4	24,3	2,2	1,1
Mínimo	365	17,5	4,5	1,4	22,3	7,7	0,5	0,8
CV(%)	14,2	9,9	2,2	47,2	20,8	32,3	22,3	12,2
	Al <sup>2+</sup>	H+Al	T	Zn	Cu	Fe	Mn	B
	C mol dm <sup>-3</sup>				Mg dm <sup>-3</sup>			
Média	0,1	4,4	7,6	3,6	1,2	181,2	7,7	0,2
Máximo	0,4	5,3	8,4	8,8	1,8	346,7	17,6	0,5
Mínimo	0	3,8	6,2	0,5	0,5	97,8	3,3	0,1
CV(%)	100	10,5	8,6	33,4	33,7	37,2	46,5	37,6

<sup>1</sup>Nota: Argila (método gravimétrico); MO (1.72x teor de carbono determinado pelo método da oxidação com dicromato de potássio em meio ácido); pH (CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, relação 1:2,5); P, K e micronutrientes (Mehlich-1, relação 1:10); Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, Mg<sub>2</sub><sup>+</sup> e Al<sub>3</sub><sup>+</sup> (KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, relação 1:10); H + Al (acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0).

Conforme realizado em laboratório, a espécie –alvo utilizada foi *I. cordifolia*. Antes da semeadura, cada vaso recebeu 200 gramas de solo com o pó das plantas e posteriormente, a espécie- alvo foi semeada nos vasos numa profundidade de ± 1,0 cm (PRATES, 2000). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e foram irrigados diariamente com água destilada, baseando-se no índice de retenção de 80% (BRASIL, 2009). Os vasos eram irrigados diariamente, conforme o índice de retenção e anotados o número de plântulas emersas em cada vaso e após 30 dias da semeadura as plantas foram colhidas.

Parte das plantas (cerca de 3 indivíduos de cada vaso) foram congeladas e levadas para laboratório, com a finalidade de avaliar o estresse oxidativo. O restante do material foi separado para avaliação do comprimento (cm) da parte aérea e da raiz, sendo essas levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca, em gramas (NINKOVIC, 2003). No presente trabalho o delineamento experimental usado foi de blocos casualizados com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1.000 mg.L<sup>-1</sup>), e três ensaios com herbicidas com quatro tratamentos (0, 10, 25, 50 mg.g), em quatro repetições. Cada parcela constituiu-se de dez sementes para emergência e crescimento.

Foi calculado o Índice de Velocidade de Emergência (IVE) [ $IVE = \Sigma(G_i/N_i)$ ] (Onde  $G_i$  é o número de plântulas emersas no intervalo de tempo  $t_{i-1} \leftrightarrow t_i$  e  $N_i$  é o número de dias após a semeadura) e a porcentagem de plântulas emersas (E%) [ $E\% = (\Sigma n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$ ] (onde  $n_i$  é o número de plântulas emersas no intervalo de tempo  $t_{i-1} \leftrightarrow t_i$  e  $N$  é o número de sementes usadas em cada tratamento).

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ . Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS, 2006).

#### 4.12.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS EM LABORATÓRIO

Para os bioensaios de atividade alelopática, foram utilizados os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e diferentes partes morfológicas de *M. foetidus*. Apenas os extratos das sementes não foram investigados uma vez que não havia material suficiente para realizar os ensaios.

Para os bioensaios de germinação e crescimento, o EEB e as frações (FH, FAE, FEA e FR) foram pesadas em balança analítica, e as soluções estoque ( $1.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foram preparadas para cada EEB e frações, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN *et al.*, 2000), sendo as concentrações de 500 e  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  preparadas por diluição. Após o preparo da solução estoque da FH, retirou-se a porção não solúvel. As soluções foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS *et al.*, 2000) com solução de KOH 0,1 N, utilizando-se pHmetro.

O EEB e as frações (FH, FCL, FAE, FR) foram ensaiadas com *C. argenteus* (Euphorbiaceae). Para os bioensaios de germinação, aplicou-se a metodologia de

MACIAS *et al.*, (2000). As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos, preparadas nas concentrações de 250 µg. mL<sup>-1</sup>, 500 µg. mL<sup>-1</sup> e 1.000 µg. mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 sementes de *Croton argenteus*, distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme BRASIL (2009). Como controle procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa (± 80%) e temperatura constante, adequadas a esta espécie, sendo estes parâmetros avaliados antes da montagem deste ensaio, onde várias temperaturas e fotoperíodos foram previamente investigados, sendo estabelecido a temperatura de 35°C e fotoperíodo de 12 horas. A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes e Colaboradores (1987); Macias e Colaboradores (2000). Primeiramente as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, e transferidas para placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação. Após quatro dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca. A germinabilidade (%G) foi calculada segundo a metodologia descrita por Labouriau (1983) e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Maguire (1962) citado por Ferreira e Borghetti (2004).

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação a testemunha, as médias foram

comparadas pelo teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

#### 4.12.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Para os bioensaios conduzidos em casa de vegetação, inicialmente o teor de água foi determinado a partir de alíquotas dos mesmos, submetidas à secagem (100 °C) em estufa por 10 horas, até que a massa fosse constante, para calcular a massa de água nos extratos e frações. Para os bioensaios, os extratos e frações foram pesados em balança analítica de precisão, levando-se em consideração o teor de água, e dissolvidos em água destilada, obtendo-se assim a solução-estoque na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações de 500 e 250 mg.L<sup>-1</sup> foram preparadas por diluição.

As soluções foram tamponadas com solução de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM e o pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 0,1 N. Como controle, preparou-se uma solução de maneira similar, mas sem os extratos e frações. Os bioensaios foram realizados com a espécie *Croton argenteus*, conforme os testes realizados em laboratório com os extratos e frações, para confirmar o efeito alelopático observado em laboratório.

Antes da semeadura, cada vaso plástico (7,0 x 6,0 cm, diâmetro e altura), recebeu 200 g de solo, cujas características físico-químicas se encontram na tabela 1. No dia da semeadura cada vaso foi irrigado com 40 mL das soluções contendo os respectivos tratamentos e posteriormente foram semeadas dez sementes em cada vaso numa profundidade de  $\pm 1,0$  cm (PRATES, 2000). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente com água destilada, baseando-se na capacidade de campo de 80% dos vasos (BRASIL, 2009).

Diariamente foi anotado o número de plântulas emersas em cada vaso e após 30 dias da semeadura as plantas foram colhidas. Posteriormente, as plantas foram colhidas, sendo que 5 plantas foram utilizadas para avaliação do estresse oxidativo

e 5 plantas utilizadas para avaliar o comprimento (cm) da parte aérea e da raiz, sendo essas levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca, em gramas (NINKOVIC, 2003).

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

#### 4.12.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DAS PLANTAS COLETADAS EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO

A avaliação do estresse oxidativo foi avaliada nos bioensaios com óleos voláteis, método de difusão em ágar, lixiviados extratos em casa de vegetação. Os tipos de enzimas envolvidas no estresse não foram idênticas para todos os ensaios, sendo que as diferenças estão relacionadas à disponibilidade de material vegetal e reagentes de laboratório.

Parte do material coletado foi levado ao laboratório para estimativa da atividade respiratória (síntese de formazan), teor de clorofila e  $\alpha$ -amilase.

Os teores de clorofila foram obtidos após a maceração das partes aéreas das plântulas em almofariz e extração com DMSO (CAYON *et al.* 1990, com modificações). As absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON 1949), conforme a fórmula:

$$\text{Clorofila total} = (5,13 \times \text{Abs } 662_{(\text{clorofila a})} + 20,41 \times \text{Abs } 644_{(\text{clorofila b})}) \times 0,25$$

A atividade respiratória (síntese de formazan) foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifênil tetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica

as raízes foram cortadas a 1,0 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas e em seguida transferidas para tubos de ensaio, onde foram adicionados 3 mL de cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0). Os tubos de ensaio foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30 °C durante 15 horas.

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez em água destilada. Os tubos de ensaio contendo as raízes foram novamente transferidos para o banho-maria com água fervente ( $\pm 100$  °C), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (V/V). Decorridos 10 minutos, as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol 95% (v/v). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro marca Shimadzu, no comprimento de onda de 530 nm (STEPONKUS; LANPHEAR 1967).

Para a determinação da  $\alpha$ -amilase, o extrato enzimático foi levado em banho-maria a 70°C durante 20 minutos, adicionando-se 100  $\mu$ L da amostra por tubo completando o volume de 1,0 mL com tampão fosfato de potássio 1,0 M e 1,0 mL de solução de amido a 1,0% (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1965). As soluções foram incubadas a 30°C por 5 minutos e em seguida foi adicionado 1,0 mL de lugol 50% e 3,0 mL de água, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm ( $\epsilon$ , 8,800  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Para avaliação das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, os materiais coletados nos diferentes ensaios foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, e o pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de Sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e PVP 1,0%. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES; XAVIER, 1991). Os extratos foram acondicionados em freezer a -18°C até o momento das análises. As preparações para a extração das enzimas foram realizados a 4 °C.

A quantidade total de proteínas presentes nas espécies avaliadas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976) através da preparação do reagente em laboratório. A concentração da proteína nos extratos foi determinada por comparação com uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA), com



concentrações que variaram entre 4,2 e 208 µg.mL, e a atividade determinada por espectrofotometria a 594 nm.

A atividade da catalase foi medida em um meio contendo 67 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), e 0,1- 0,4 mg de proteína do extrato enzimático. O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado a 240 nm ( $\epsilon$ , 0,036 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (AEBI, 1984).

A atividade da peroxidase (POD) foi medida em um meio contendo tampão fosfato de Potássio 25 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 Mm) Guaiacol (2,6 mM) e 0,1- 0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A formação de Tetraguaicol ( $\epsilon$ , 25,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi monitorada a 470 nm (PUTTER, 1974).

A determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi estimada de acordo com Amako e Colaboradores (1994), com um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A taxa de oxidação do ascorbato foi monitorada a 290 nm ( $\epsilon$ , 2,8mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Atividade de superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). O meio continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) e L- metionina 6,5 mM, azul de nitrotetrazólio (NBT) 150 µM, riboflavina 4 µ M e 0,02-0,1 mg de proteína do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela ativação de uma luz (20 W) e iluminando o meio durante 20 minutos a 30 ° C. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50% da taxa de fotoredução (NBT) a 560 nm, e os resultados foram expressos como unidades de SOD. µg. proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da polifenoloxidase foi determinada pela conversão do catecol em quinona (DUANGMAL; APENTEN, 1999). O substrato utilizado continha catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de Sódio 100 mM (pH 6,8), e adicionado 0,01-0,04 de extrato enzimático protéico. A reação ocorreu a 30 °C e as absorbâncias lidas a 420 nm ( $\epsilon$ , 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

A atividade da glutathiona reduzida foi medida num meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, Glutathiona dissulfeto (GSSG) 0,5 mM , NADPH 0,15 mM, e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A taxa de oxidação do NADPH foi monitorizada a 340 nm ( $\epsilon$ , 6,2 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (FOYER; HALLIWELL 1976).

A atividade do citocromo C oxidase foi medida em 550 nm pela alteração no seu estado de oxidação, onde o citocromo C é reduzido com ditioneitol e então reoxidado pelo citocromo C oxidase (STORRIE; MADDEN, 1990). Para 0,1-0,4 mg de extrato enzimático protéico foram adicionados 950 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 Mmol seguidos de 500µL de ferrocitocromo C. Após a adição, a leitura foi realizada a 550 nm em leitor de microplacas ( $\epsilon$ , 21,84 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

A peroxidação lipídica foi medida num meio contendo 0,1% de ácido tricloroacético, 0,5% de ácido tiobarbitúrico e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático (GOMES-JÚNIOR *et al.* 2006). A absorbância foi lida a 534 nm e a atividade expressa como percentagem do estímulo de peroxidação lipídica.

As atividades das enzimas foram calculadas segundo Bracht e Colaboradores, (2003). Para todas as enzimas descritas, foram acrescentados 10 µl de extrato enzimático, com as soluções reagentes específicos para cada dosagem enzimática. A absorbância dessas amostras foi monitorada durante 0 a 9 minutos, e em seguida plotado um gráfico para cada dosagem enzimática, para obtenção da variação da tangente, onde:

$$\alpha \text{ tg} = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Sendo:  $\Delta A$  = a variação da absorbância e

$\Delta t$  = a variação do tempo (minutos).

Após as leituras das absorbâncias das enzimas, a atividade foi calculada em µmol. min<sup>-1</sup> através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \frac{\text{vol de incubação} \times \alpha \text{ tg (min}^{-1})}{\text{Coeficiente de extinção molar da enzima } (\epsilon)} = \text{unidades de enzima}$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, ( $p < 0,05$ ), em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

#### 4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

Nos ensaios de atividade antineoplásica, todo o manuseio das células foi realizado segundo Freshney (1994). Nos ensaios, foi utilizado o método da SRB (sulforodamina B) descrito por Skehan e Colaboradores (1990), com utilização de microscópio invertido da ZEISS (Modelo Axiovert 25) em aumento de 400 X para a observação do crescimento das células.

A inibição do crescimento celular, um indicador da citotoxicidade, causada pelos compostos avaliados quanto à atividade antineoplásica, foi avaliado nos extratos e frações dissolvidas em DMSO (0,1%) nas concentrações de 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para os testes, foram utilizadas células neoplásicas da linhagem MCF7 (carcinoma de mama), K562 (leucêmicas), NCI-ADR/RES (ovário resistente), OVCAR-3 (ovário), 786-0 (rim), UACC-62 (melanoma), HT-29 (colo), PC-3 (próstata), cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho - CPQBA/ UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas em Campinas – SP), para a realização dos experimentos.

As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura, RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U.mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina (meio completo) e mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida e contendo CO<sub>2</sub> (5%). Uma vez que estas células são aderentes, foi necessário fazer a remoção com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação a baixa rotação, o meio e tripsina foram desprezados e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo, e feita a contagem com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer onde em cada cavidade da placa de 96 poços foi depositado um volume de 100  $\mu\text{L}$  de meio contendo 10.000 células (100000.mL).

Após 20 horas, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado e as concentrações dos extratos e frações foram adicionadas. Foram adicionados os extratos e frações nas diferentes concentrações em triplicata. No controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer extrato e

contendo somente meio de cultura contendo DMSO 0,5% (o solvente utilizado para dissolver os extratos e frações).

Em todos os testes foi utilizado um controle positivo, Doxorubicina da Sigma. Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora a 37 °C, até o final do período de exposição das células aos compostos-teste (48 h). O teste adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforodamina B (SRB, Sigma). Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, cujas proteínas são precipitadas pelo ácido tricloro acético (TCA – Sigma). E deste modo, em 48 horas o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram então incubadas por meia hora, a 4°C em geladeira, e posteriormente, a solução TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente.

Em seguida foram adicionados 50 µL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente incubada por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1%, secas e adicionado Tris Base 10mM (Sigma). Em seguida foram submetidas a uma agitação de 10 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância medida a 540 nm em leitor de microplacas.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados o extrato etanólico bruto e as frações obtidas dos extratos das folhas, casca e frutos de *M. foetidus* e *A. extraaxilaris*. A metodologia empregada foi a do método de concentração inibitória mínima (CIM). Uma coleção de dez microorganismos foi usada incluindo 8 bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Bacillus subtilis* (ATCC 23856), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), e 4 fungos: *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC

28707), *saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36375); *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) e os antibióticos cloranfenicol e nistatina foram utilizados como padrões.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em 96 placas de cultura usando o método de microdiluição e usando uma suspensão de micro-organismos com uma densidade de  $10^5$  UFC.mL com caldo de caseína-soja, incubado por 24 horas a 37°C para bactérias. Para fungos foi utilizado caldo Sabouraud, com um período de incubação de 72 horas a 25°C. As culturas que não apresentaram crescimento foram usadas para inocular placas de meio sólido (Agar Muller Hinton e Agar Soubouraud) com o objetivo de determinar a concentração mínima letal (CML). As amostras controle e testes foram ensaiadas simultaneamente, em triplicata, conforme técnica descrita previamente (HAMMER *et al.*, 1999; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1995).

#### 4.15 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *M. foetidus* e *A. extraaxillaris* POR MEIO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos (ALVES *et al.*, 2010).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, a atividade antioxidante dos extratos e das frações foram determinadas através de sete ensaios antioxidantes: DPPH, poder redutor

(azul da prússia), complexo fosfomolibdênio, tiocianato férrico, peroxidação lipídica (TBARs), redução da desoxirribose e sequestro do radical  $H_2O_2$ .

#### 4.15.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL 2,2- DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA DPPH

Um dos métodos mais utilizados para análise da atividade antioxidante é a redução do radical DPPH, este consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm (MENSOR *et al.*, 2001). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ( $R^\bullet$ ), o DPPH• reduzido forma o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

Esse ensaio foi realizado de acordo com Mensor e Colaboradores (2001), e a avaliação da capacidade antioxidante quantitativa tem como base a redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível. A solução de DPPH foi preparada minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em etanol absoluto. Foram preparadas cinco diluições de cada amostra, com concentrações que variam entre 5 µg.mL a 200 µg.mL Em cada tubo de ensaio foi adicionado 2,5mL de cada amostra diluída e 1 mL da solução de DPPH. As mesmas amostras diluídas (2,5 mL) com 1 mL de solvente (FM e FAC: metanol e FH e FC: hexano) sem reagir com DPPH constituem o branco da reação. E o controle corresponde a 2,5 solvente com 1mL de solução de DPPH. Estas são deixadas reagir em repouso por 30 minutos na temperatura ambiente.

Como padrões foram utilizados a vitamina C e a Rutina. Após os 30 minutos, foi medido a Abs das soluções em 518 nm. Todas as etapas foram feitas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}) \times 100}{\text{Abs do controle positivo}}$$

Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ( $IC_{50\%}$ ) foram calculados no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra da fração e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, onde  $y = ax + b$ , serve de base para determinação do valor de  $IC_{50\%}$ .

#### 4.15.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Neste ensaios, as amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), e a partir do material seco, bem como das substâncias isoladas foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200 µg.mL. Destas, 0,3mL foram adicionados à 3mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, usando 0,3mL de metanol com 3mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200 µg.mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00 (PRIETO, PINEDA; AGUILAR, 1999).

Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C, conforme a fórmula:

$$AAR\% \text{ em RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}}$$

#### 4.15.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA)

No teste de atividade antioxidante pelo azul da Prússia, os extratos e frações nas concentrações de 200µg.mL foram transferidos para tubos de ensaio de 25 mL, e adicionados tampão fosfato de potássio a 0,2 M (pH 7,0) e ferricianeto de potássio a 1,0%. A mistura foi incubada a 45 °C por 20 min., e em seguida o ácido tricloroacético a 1% foi adicionado aos tubos de ensaio. Cerca de 2,5 mL foram transferidos para tubos de ensaio de 5,0 ml, e adicionados 1,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 1,0 mL de etanol e 0,5 mL de FeCl<sub>3</sub> a 1,0% (p/v). A leitura foi realizada a 700 nm (YEN; CHEN, 1995). Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C, conforme a fórmula:

$$AAR\% = \frac{Abs_{(amostra)}}{Abs_{(Vitamina\ C)} - Abs_{(branco)}}$$

#### 4.15.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TIOCIANATO

A atividade antioxidante pelo método do tiocianato férrico, os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* na concentração de 200 µg.mL foram diluídos em 1,0 mL de etanol e em seguida, 250 µL de etanol, 550 µL de ácido linoleico a 2,51% (p/v) em etanol (99,0% v/v), 2,0 mL de tampão fosfato 0,05 mols/L (pH 7,0) e 900 µL de água destilada foram adicionados aos tubos deixados em banho-maria a 50,0 ± 0,5 °C. Para 25 µL desta solução foram adicionados 3,25 mL de etanol 75% (v/v), 25 µL de tiocianato de amônio a 30% (p/v) e 25 µL de cloreto ferroso 0,02 mol.L. Após 3 minutos de reação à temperatura ambiente (25,0 ± 0,5 °C), as amostras foram transferidas para microplacas e realizada leitura da



absorbância a 500 nm, em leitor de microplacas, a leitura se repetiu a cada 24 horas, até que a cor púrpura do controle alcançasse um valor máximo (KIKUZAKI; NAKATANI, 1993; RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004). O antioxidante BHT (Butylated hydroxytoluene) foi utilizado como padrão para estes ensaios.

A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{AAR\% em RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})} \times 100}{\text{Abs}_{(\text{controle})}}$$

#### 4.15.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MÉTODO TBARS- SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)

No ensaio da atividade antioxidante pelo método TBARS, foi utilizada a metodologia proposta por Moraes e Colaboradores (2006) com modificações. Cerca de 3 mg das amostras (extrato e frações) e padrões BHT e Vitamina C, foram diluídos em 1,0 mL de etanol. Todo o procedimento foi realizado em triplicata. Um volume de 0,5 mL de solução de gema do ovo homogeneizada (5% m/v), meio rico em lipídeos, e 0,1 mL de cada amostra e controle foram adicionados a tubos de ensaio. Cada um dos tubos de ensaio, em seguida, recebeu 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis (2 amidinopropano) dicloridrato - ABAP (0,035%) para induzir a peroxidação lipídica.

Adicionou-se 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico – TBA (0,4% m/v) em solução de sulfato de dodecil de sódio – SDS (0,55% m/v) e 400 µL de água destilada. O material assim preparado foi submetido ao banho maria (95 °C) durante 1 hora sob agitação. Após resfriamento, cada tubo

recebeu 1,5 mL de n-butanol e foi centrifugado durante 3 minutos a 3.000 rpm, com posterior leitura espectrofotométrica dos sobrenadantes a 532 nm.

A porcentagem de inibição na peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{1 - \text{Abs}_{(\text{amostra})}}{\text{Abs}_{(\text{controle})}} \times 100$$

#### 4.15.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE

A capacidade dos extratos para evitar a decomposição da desoxirribose induzida pelo Fe<sup>++</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada usando o método de Halliwell e Gutteridge (1981). Para os ensaios com os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* 500 µg.mL de solução foram adicionadas em 120 µL de solução de desoxirribose 20 µmol.L, 0,125 mL de tampão fosfato de sódio 0,1mol.L, 40µL de peróxido de hidrogênio 20 µmol.L, 40 µL de sulfato ferroso 500 µmol.L e 500 µL de água destilada. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após foram adicionados 500 µL de solução de ácido tricloroacético 2,8% e 400 µL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi novamente incubada a 30°C por 20 minutos. A leitura foi realizada em 532 nm. O antioxidante vitamina C foi utilizado como padrão, na concentração de 500 µg.mL.

#### 4.15.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A habilidade dos extratos em sequestrar peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o método descrito por RUCH; CHENG; KLAUNIG (1989), uma solução (4 mmol.L) de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4). A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 230 nm.

Para cada 100 µl de solução dos extratos e frações semipurificadas de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* na concentração de 500 µg.mL foram adicionados 900 µL de etanol e 600 µL de peróxido de hidrogênio 20 µmol.L. A vitamina C foi utilizada como padrão, na concentração de 500 µg.mL. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente (25,0 ± 0,5°C) realizou-se leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 230 nm, contra a solução branco contendo os extratos e frações em solução de tampão sem peróxido de hidrogênio. O cálculo da atividade sequestradora de peróxido de hidrogênio deu-se por meio da fórmula:

$$\% \text{ de seqüestro do H}_2\text{O}_2 = 100 - \frac{\text{Abs}_{(\text{controle})} - \text{Abs}_{(\text{amostra})} \times 100}{\text{Abs}_{(\text{controle})}}$$

#### 4.15.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS DIFERENTES MÉTODOS EMPREGADOS

Para cada amostra avaliada, foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

#### 4.16 REDUÇÃO NO NÚMERO DE ABERRAÇÕES INDUZIDAS PELO HERBICIDA ATRAZINA

O herbicida Atrazina [6 Cloro-N-etil-N' (1-metil-etil) 1,3,5-triazina-2,4-diamina] é um herbicida amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas, seletivo para eudicotiledôneas e monocotiledôneas. Ele é absorvido pelas plantas através das raízes, e se acumula no ápice (KIDD; JAMES, 1991). É um inibidor do transporte de elétrons na fotossíntese, que prejudica a reação de Hill pela cadeia de transporte de elétrons através da ligação entre a polifenoloxidase e o complexo B do fotossistema II (SCHULZ *et al.*, 1990).

Devido à sua elevada estabilidade, este herbicida é o principal contaminante encontrados em água doce, e a substância desetilatrazina que é o seu principal componente, foi detectado em tecidos de animais, solo e água (DE LORENZO *et al.*, 2001).

A contaminação ambiental por atrazina poderia impactar negativamente a estabilidade do ecossistema. Devido a estas considerações, estudos foram realizados para entender melhor se este herbicida pode afetar a saúde humana. A atividade clastogênica do herbicida atrazina foi verificada pelo teste *Allium cepa* (BOLLE *et al.*, 2004), em células de ovário de hamster chinês (TAETS *et al.*, 1998), e em linfócitos humanos (RIBAS *et al.*, 1995 ). Atrazina é tóxico para diferentes espécies de anfíbios (CLEMENTS *et al.*, 1997; FREEMAN; RAYBURN, 2004), e uma série de estudos recentes indicam que a atrazina é um desregulador endócrino (SANDERSON *et al.*, 2000; THOMAS; DOUGHTY , 2004).

A fim de analisar o efeito protetor dos extratos na ação do herbicida Atrazina, sementes de *A. cepa* foram germinadas em água destilada e em seguida, submetidas as soluções do herbicida na concentração de 0,2 µg/ml. Após um período de 24 horas de exposição, as plântulas em estado inicial de crescimento foram submetidas às concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do padrão quercetina e concentrações de 125, 250 e 500 µg/mL dos extratos. Após 24 e 48 horas de exposição aproximadamente metade das amostras foram recolhidas e fixadas em álcool 70%. Para o controle, procedimento similar foi utilizado, porém com a ausência dos padrões. As técnicas utilizadas para a visualização das células foram

os propostos por Fernandes e Colaboradores (2007) e Fiskesjo (1985), utilizando o reagente de Schiff, seguido de carmim acético (1,0%).

Cerca de 1.5000 células foram contadas para cada concentração testada e controle (1.000 para cada ensaio). Através de análises citológicas, foram observadas células portadoras de anormalidades e quantificado o índice de alterações cromossômicas, segundo a fórmula:

$$\text{IAC (índice de alterações cromossômicas)} = \frac{\text{número de células alteradas} \times 100}{\text{total de células observadas}}$$

#### 4.17 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE A *Artemia salina* EM LABORATÓRIO

Para os ensaios de atividade tóxica frente *Artemia salina*, foi utilizada a metodologia de Meyer (1982), com adaptações, onde os náupilos foram submetidos a variadas concentrações dos extratos, frações e óleos voláteis.

A água do mar artificial foi preparada utilizando 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) em 400 mL de água destilada. Em seguida foi colocada em um becker de 1000 mL, e o pH ajustado entre 8 a 9, com carbonato de sódio. Os ovos de *A. salina* Leach (200 mg/ 400 mL) foram adicionados na água e mantidos sob agitação e aeração constantes por um período de 48 horas para a eclosão dos ovos. Na primeira hora do processo foi mantida a iluminação de 20 W sendo a temperatura controlada entre 26 a 30° durante as 48 horas.

Nos ensaios com *A. salina*, foram utilizadas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg.mL para os óleos voláteis de *M. foetidus*, diluídos em DMSO (0,2%) e concentrações de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg.mL, diluídos em solvente, conforme o grau de polaridade de cada extrato e fração. Os solventes utilizados foram hexano para as frações hexano, clorofórmio para a fração clorofórmio, acetato para a fração acetato e etanol para o extrato bruto e fração hidroalcolica. As concentrações foram pipetadas em tubo, sendo que cada solvente foi pipetado em

tubos como controle negativo. Soluções de triton nas mesmas concentrações preparadas em metanol e utilizadas como controle positivo. Os tubos foram colocados em estufa a 50 °C por 24 horas para eliminação do solvente.

Nos ensaios com os óleos voláteis, as soluções foram preparadas no momento do ensaio com as larvas de *A. salina*, uma vez que a substituição de solvente por DMSO, não necessita de secagem em estufa, o que levaria à volatilização dos óleos.

Após a eclosão dos ovos, cerca de 25 náuplios de *Artemia salina* Leach foram transferidos em cada tubo. O volume de todos os tubos foi ajustado para 2,5 mL com água do mar artificial. Também foi realizado um controle negativo com água do mar artificial. Após 24 horas foi realizada a contagem de náuplios mortos e vivos. Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos, onde foram determinados os valores de CL<sub>50</sub>. Resultados de CL<sub>50</sub> maiores que 1000 µg/ mL indicam a não toxicidade dos extratos (MEYER; 1982).

#### 4.18 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À *Dugesia tigrina* EM LABORATÓRIO

*Dugesia tigrina* foram coletadas na lagoa do parque Arnulpho Fioravante em Dourados- MS, sendo arrancados do barranco aguapés e batidos em bacias contendo água do rio. Cubos de fígado de boi com cerca de 10 gramas também foram utilizados para a coleta, sendo deixados submersos por cerca de 20 minutos.

As planárias coletadas foram levadas ao laboratório do centro e zoonozes de Dourados e triadas para os ensaios toxicológicos, sendo utilizadas planárias com cerca de 5-7 mm. As planárias foram ambientadas em estufa tipo BOD, durante 24 horas para ambientação, com temperatura constante de 20°C (±0.5) e fotoperíodo de 12 horas, mantendo-se aeração com regulação baixa e constante (com taxa de, aproximadamente, uma bolha de ar por segundo), como proposto por Guecheva e Colaboradores (2003).

No dia do ensaio, os extratos e frações nas concentrações de 0,10, 100 e 1000 µg/mL dissolvidos em DMSO 0,5%. Para todos os testes seguiram-se os cuidados e diretrizes desenvolvidos por Kovačević e Colaboradores (2009); Medvedev (2008), para testes com planárias. Para cada teste, foram mantidos organismos-controle nas mesmas condições padrão que os organismos-teste.

No trabalho realizado, utilizou-se o *edpoint* estabelecido por Annibale (2006), estimado pelo efeito agudo, que corresponde à mortalidade dos indivíduos; e o efeito crônico, definido como o atraso na regeneração da região cefálica. Os testes preliminares de regeneração foram realizados a fim de padronizar o tempo de regeneração cefálica dos animais utilizados sob as condições de laboratório, comparando-se o tempo obtido com o especificado na literatura científica, bem como identificar as possíveis alterações no tempo de regeneração das planárias quando expostas a substâncias químicas nos bioensaios.

Os testes foram realizados com cinco réplicas para cada concentração, além de um organismo controle, ou seja, para cada concentração do soluto foram selecionados cinco indivíduos mais um indivíduo que seria do grupo controle, totalizando 30 (trinta) organismos, sendo o teste definido para 24 horas do início do processo. As planárias utilizadas nos testes de sensibilidade não receberam alimentação e aeração durante os bioensaios. Como controle positivo (que causa a toxicidade), foi utilizada uma solução de dicromato de potássio na concentração de 35 µg/mL conforme estipulado por Annibale (2006).

Após as 24 horas para o ensaio tóxico, foi estimada a mortalidade dos indivíduos, e quando a mortalidade foi verificada, novas planárias que não foram submetidas à extratos e frações tiveram a região cefálica retirada e foram submetidas novamente aos extratos e frações, sendo a regeneração observada a cada 24 horas, até completarem 10 dias de regeneração.

Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos, onde foram determinados os valores de  $CL_{50}$ . Resultados de  $CL_{50}$  maiores que 1000 µg/mL indicam a não toxicidade dos extratos (ANNIBALE, 2006).

No ensaio de regeneração cefálica, os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

#### 4.19 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*

##### 4.19.1 AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

A atividade larvicida dos extratos, frações e óleos voláteis sobre *Aedes aegypti* foi realizada segundo metodologia do World Health Organization (1981a) com algumas modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Osvaldo Cruz - RJ; sendo utilizada como padrão de susceptibilidade à inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (HARTBERG; CRAIG, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 mL de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$ .

A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval, e foram preparadas soluções de concentração de  $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos extratos e frações, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro em concentrações distintas de 1.000, 500, 250 e  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para os testes.

Foram colocados em copos de plástico as amostras contendo 15 larvas nos 1º, 2º, 3º e 4º estádios e o volume foi completado para 5 mL. Para cada concentração foram usadas 45 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo.

O inseticida utilizado como controle positivo (que causa a mortalidade das larvas) foi o temefós grau técnico 90% lote 005/2011 fabricado por laboratórios “Fersol Mairinque”, São Paulo, e feita a calibração segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito em Who (1981 a,b), Lima e Colaboradores (2003); Braga e Colaboradores (2004) utilizando como concentração diagnóstico (CD)  $0,060 \text{ mg.mL}$  (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% de uma cepa susceptível, como definido pela WHO (1981 a,b). O protocolo compreende a resposta de mortalidade frente à exposição em



concentração diagnóstico (CD) na exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM).

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981a). Os valores da concentração letal ( $DL_{50}$ ) em  $\mu\text{g.mL}$  foram determinados utilizando o método de análise Probit (FINNEY, 1971). Para cada amostra avaliada, foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

#### 4.19.2 PREPARO DO HOMOGENEIZADO DE LARVAS DE *A. aegypti* SUBMETIDAS AOS ÓLEOS VOLÁTEIS, EXTRATOS E FRAÇÕES, DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TRIPSINA E QUIMIOTRIPSINA E ACETILCOLINESTERASE

Homogeneizados das larvas de *A. aegypti* submetidas aos extratos e frações, durante 6 horas foram preparadas de acordo com Macedo e Colaboradores (1993) com modificações. As larvas foram homogeneizadas manualmente em gral de porcelana em 1,0 mL de tampão Tris/HCl em 0,05 M (pH 8,0) e centrifugadas a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4° C, e os sobrenadantes foram recolhidos, sendo adicionados mais 1,0 mL de tampão Tris/HCl.

A concentração de proteínas presentes nas larvas submetidas nos extratos e frações foi determinada de acordo com Lowry e Colaboradores (1951) usando albumina de soro bovino (31,25-500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como padrão.

A atividade total de tripsina foi determinada utilizando o reagente BAPNA (N-benzoil-D, L-arginina-p-nitroanilida) como substrato. Cerca de 500  $\mu\text{L}$  do homogeneizado de larvas foi adicionado a 1 mL de BAPNA e deixados em repouso por 20 minutos a 37 ° C, em seguida a reação foi parada pela adição de ácido

acético a 30% (v/v). A atividade da tripsina foi mensurada em leitor de microplacas a 410 nm ( $\epsilon$ ,  $10.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) conforme Silva e Colaboradores, (2009b).

A atividade da quimiotripsina foi determinada usando SAAP (N-succinil-Ala-Ala-PRO-PHE-p Nitranilida) como substrato. Cerca de 50  $\mu\text{L}$  dos homogeneizados foram incubadas em 450  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de substrato SAAP 2 Mm, dissolvidos em DMSO puro (dimetilsulfóxido). A mistura de reação foi incubada a 37 ° C durante 20 min, e em seguida a reação foi finalizada pela adição de ácido acético 30% (v/v). A absorbância foi lida a 405 nm ( $\epsilon$ ,  $8,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (SILVA *et al.*, 2009b).

Para a avaliação da acetilcolinesterase, 10  $\mu\text{L}$  dos homogeneizados de *A. aegypti* foram incubados com 20  $\mu\text{L}$  acetilticolina, 0,062  $\mu\text{L}$  de DTNB 0,25 mM durante 3 min a 25 °C (ELLMAN, 1961). O aumento na absorbância foi lido a 405 nm ( $\epsilon$ ,  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

A média do teor de umidade encontrada nas amostras variaram em função das espécies e partes morfológicas, sendo os valores demonstrados na tabela 2. De acordo com os dados obtidos, observa-se que maior umidade foi observada para os frutos de *M. foetidus* (3,41%), seguido das sementes (3,24%). O teor de umidade é importante para o conhecimento básico, podendo ser utilizado como parâmetro para o controle de qualidade de amostras, possibilitando a segurança para análises posteriores, na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes. Os métodos de secagem em estufa determinam não somente a perda de água, como também dos demais constituintes volatilizados juntamente com a água (ISENGARD; FÄRBER, 1999; FARIAS, 2003).

TABELA 2. TEOR DE UMIDADE DE *A. extraaxillaris* E DIFERENTES PARTES MORFOLÓGICAS DE *M. foetidus*.

Espécie	<sup>1</sup> Teor de umidade (%)
<i>A. extraaxillaris</i>	1,03±0,57
<i>M. foetidus</i> - folhas	1,08±1,16
<i>M. foetidus</i> -cascas	2,66±1,22
<i>M. foetidus</i> - frutos	3,41±1,35
<i>M. foetidus</i> - sementes	3,24±1,26

<sup>1</sup> Nota: Média ± Desvio padrão.

### 5.2 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

O conteúdo de cinzas totais estabelece a qualidade de substância residual não volátil no processo de incineração (CÍRIO *et al.*, 2003). Os dados obtidos na análise de cinzas totais contribuem significativamente no controle de qualidade e padronização de matéria- prima. Um menor rendimento no teor de cinzas ocorreu para a espécie *A. extraaxillaris*, seguido das folhas de *M. foetidus*, onde as demais partes morfológicas de *M. foetidus* apresentaram valores superiores: 2,12% para cascas, 2,27% para frutos e 2,43% para as sementes (tabela 3). Em se tratando de drogas vegetais, o principal objetivo deste tipo de ensaio é a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

TABELA 3. CINZAS TOTAIS PRESENTES EM *Asemeia extraaxillaris* E Diferentes Partes Morfológicas De *Microlobius foetidus*.

<b>Espécie</b>	<b><sup>1</sup>Cinza totais (%)</b>
<i>A. extraaxillaris</i>	1,25±0,53
<i>M. foetidus</i> - folhas	1,11±0,77
<i>M. foetidus</i> -cascas	2,12±0,69
<i>M. foetidus</i> - frutos	2,27±0,46
<i>M. foetidus</i> - sementes	2,43±0,88

<sup>1</sup> Nota: Média ± Desvio padrão.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS RAÍZES DE *A. extraaxillaris* E FOLHAS DE *M. foetidus*

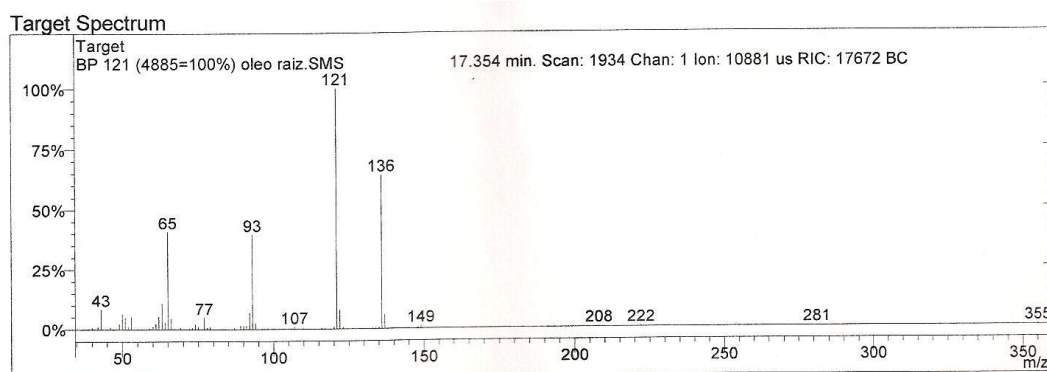
A análise dos constituintes químicos de óleos essenciais por CG-MS e RMN (tabela 4, figura 6) revelaram a presença da substância 1 - (2-hidroxifenil)-etanona (figura7), que representa 78% da composição do óleo, com um tempo de retenção de 17,354 minutos, e um índice de retenção de kovats (KL) de 1161 (na literatura:

1160, segundo ADAMS, 2001). A substância foi identificada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , como demonstrado nas figuras 8 e 9. Os fragmentos obtidos como o íon molecular  $m/z = 136$ , e os seus fragmentos 121, 93, e 65 (figuras 8 e 9), também caracterizaram a 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona. Os dados dos espectros de massas são compatíveis com dados da literatura (BENTLEY; BRACKETT; CHAPYA, 1984).

TABELA 4.  $^1\text{H}$  DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE RMN  $^{13}\text{C}$  E RMN- $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA (2-HIDROXIFENIL)-ETANONA.

Posição	$^1\text{H}$ NMR (ppm)	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (ppm)
1	-	-	119.7 (s)
2	-	-	162.3 (s)
3	7.73 (d)	8.4	118.4 (d)
4	6.89 (dd)	7.4, 8.0	136.4 (d)
5	7.43 (dd)	7.8, 7.4	118.9 (d)
6	6.97 (d)	7.2	130.6 (d)
7	-	-	204.5 (s)
8	2.62 (s)	-	26.6 (q)

Nota: d= duplete, dd= duplo duplete, J= constante de acoplamento



Spectrum from GC/MS/oleo raiz SMS

FIGURA 6. CROMATOGRAMA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. EXTRAAXILLARIS* OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO.

Após o isolamento da 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona, que se apresenta como uma substância líquida levemente amarelada, por meio de cromatografia em camada delgada, a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figuras 8 e 9) obtidos

confirmou a identificação da 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona. O espectro apresentou  $\delta$ : 2,6 (3H, s), 6,9 (1H, 2d), 7,2 (1H, d); 7,4 (1H, 2d); e 7,7 ppm (1H, d). Os deslocamentos químicos entre 6 e 8 ppm caracterizam o anel aromático, representando os hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6. O deslocamento químico para o grupo  $\text{CH}_3$  é em torno de 2, o pico na forma de singlete indica que não há hidrogênios nos carbonos adjacentes para acoplamento (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostrou apresentou  $\delta$ : 26,2; 118,4; 118,9; 119,7; 130,6; 136,4 e 204,5 ppm. Os valores de deslocamento compreendidos entre 118,4 a 136,4 correspondem aos C presentes no anel aromático; o deslocamento de 26,2 corresponde ao C da metila presente na cetona e o deslocamento de 204,5 ppm ao C do grupamento carbonila (tabela 3).

A 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona também foi relatada como o principal constituinte do óleo essencial das raízes de *Carissa edulis*, foi identificada no lenho e na casca de *Chione glabra*, e em menores concentrações nas flores de *Castanopsis caspidata* e *Castanea creata* (BENTLEY; BRACKETT; CHAPYA, 1984). Nas raízes de *Carissa opaca* a 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona também foi encontrada como o principal constituinte do óleo essencial correspondendo a 89,5% (GOPAL *et al.*, 2009). Nas partes aéreas de *Tagetes mendocina* foi verificada a presença de 1-(2-hidroxi-fenil)-etanona, esta substância isolada demonstrou atividade antiprotozoária sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* and *L. infantum* (LIMA *et al.*, 2009).

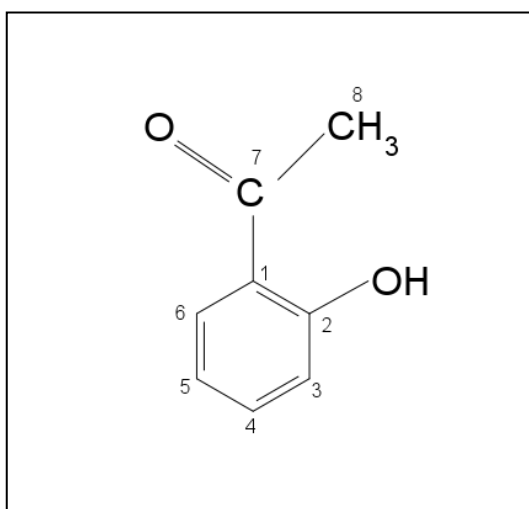


FIGURA 7. ESTRUTURA DA MOLÉCULA 1-(2-HIDROXI-FENIL)-ETANONA.

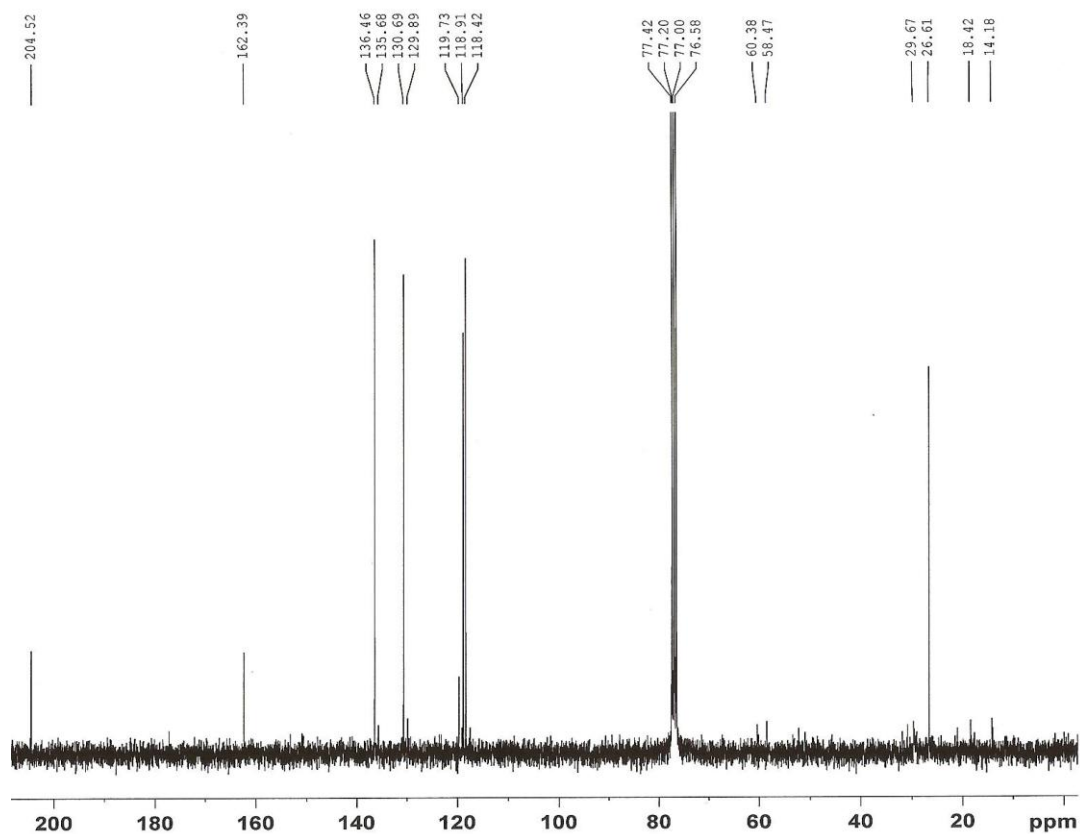


FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN<sup>13</sup>C DA SUBSTÂNCIA 1 - (2-HIDROXIFENIL)-ETANONA

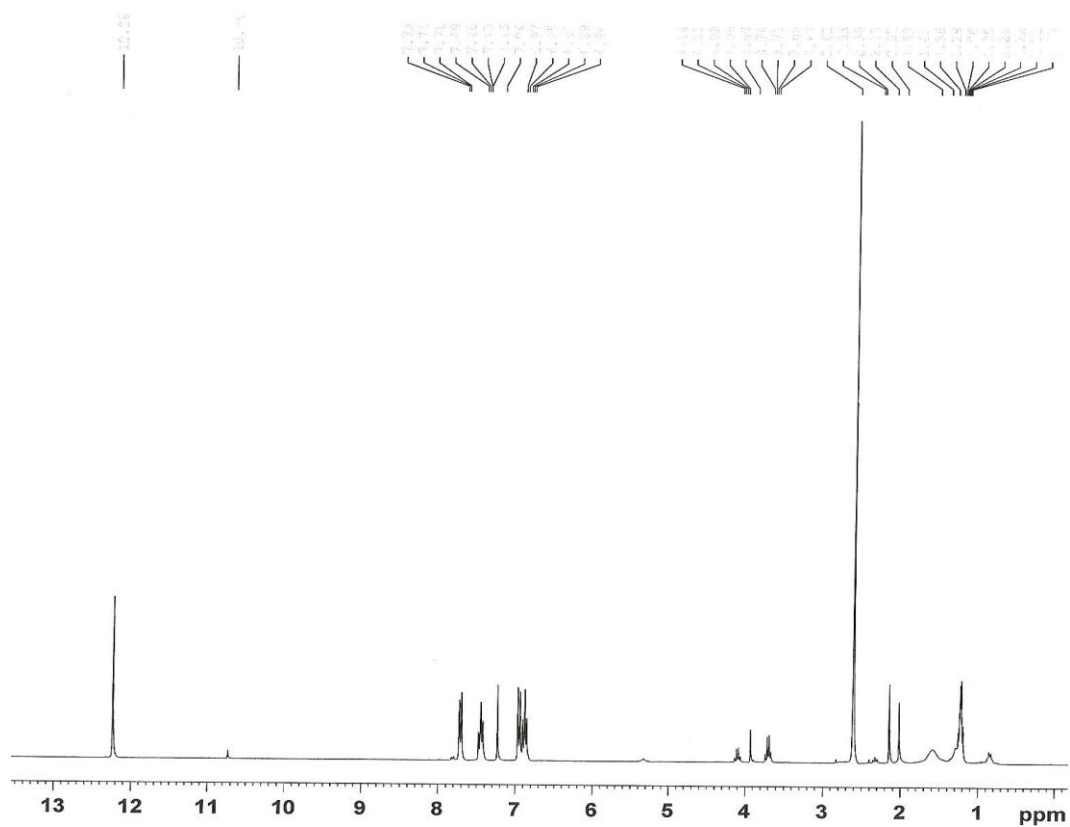


FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA 1 - (2-HIDROXIFENIL)-ETANONA).

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO E MICRO- EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

As análises foram realizadas nos óleos voláteis das folhas de *M. foetidus* obtidas por hidrodestilação e micro extração em fase sólida (Solid Phase Microextraction- SPME). Dez polissulfetos cíclicos foram identificados em ambos os perfis cromatográficos (figura 10). No entanto, foram observadas algumas diferenças na composição química destes óleos voláteis, de acordo com o método de extração, onde uma maior porcentagem da substância 1,2,4-trithiolane foi identificada em ambos os métodos.

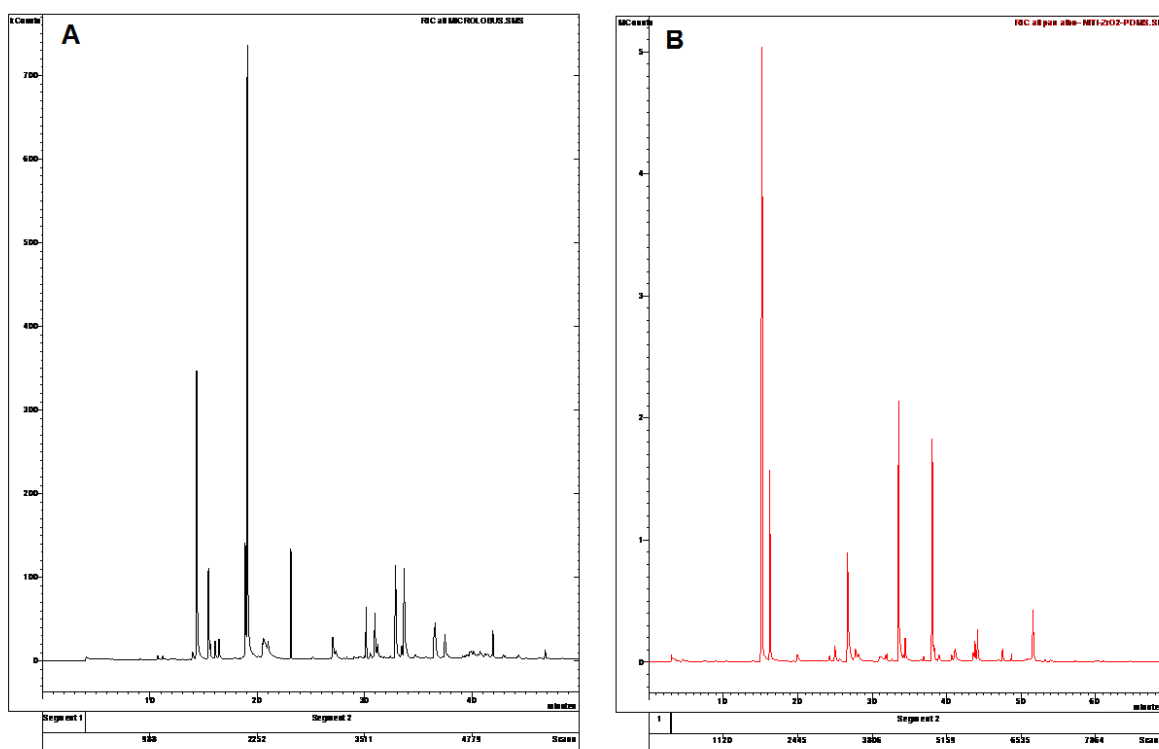


FIGURA 10. CROMATOGRAMA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO (A) E MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (B).

Seis substâncias foram identificados a partir dos óleos voláteis obtido por hidrodestilação, o que representa 80% da composição total destes óleos. As substâncias identificadas foram os polisulfetos cíclicos 1,2,4-tritiolano (29,6%), 1,3,5-tritiano (9,4%), 1,2,4 tritiolano-3,5-dimetil (4,0%), 1,2,4,6-tetratiepiano (11,7%) e



1,2,5,6-tetratiocano (11,2%). O método de extração por micor extração em fase sólida, tornou possível identificar 12 substâncias 1,2,4-tritriolano (31,8%), 1,3,5-tritiano (8,5%), 1,2,5-tritiepiano (0,2%), 1, 2,4,5-tetratiano (7,0%), 1,2,3,4-tetratiano (0,3%), 1,2,4,6-tetratiepano (12,3%), 1,3,5,7,9-pentatiecano (1,2%), 1,2,5,6-tetratiocano (0,4%), lenthionina (10,2%), hexatiepano (1,1%), sulfeto octamico cíclico (3,4%). A tabela 4 lista as substâncias identificadas em ambos os métodos, e as substâncias 1,2,4-trithiolane, 1,2,5,6-tetrathiocane e 1,2,4,6-tetrathiepane foram consideradas consideradas majoritárias, e suas estruturas encontram-se representadas na figura 11.

TABELA 5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS OLEOS VOLÁTEIS DE *Microlobius foetidus* OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: HD (HIDRODESTILAÇÃO), SPME (MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA).

Substâncias <sup>a,b</sup>	F.M.	R <sup>c</sup>	HD	SPME
<b>1,2,4-tritriolano</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	095	29.6 ± 2.2	31.8 ± 5.6
<b>E-3,5-dimetil-1,2,4-tritriolano</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S <sub>3</sub>	142	4.0 ± 0.4	-
<b>Z-3,5-dimetil-1,2,4-tritriolano</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S <sub>3</sub>	150	4,5 ± 0.7	-
<b>1,3,5-tritiano</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	249	9.4 ± 0.6	8.5 ± 1,2
<b>1,2,5-tritiepiano</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S <sub>3</sub>	300	-	0.2 ± 0,0
<b>1,2,4,5-tetratiano</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>4</sub>	318	5.5 ± 0.0	7.0 ± 0,5
<b>1,2,3,4-tetratiano</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	354	-	0.3 ± 0.2
<b>1,2,4,6-tetratiepano</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	488	11.7 ± 0.5	12.3 ± 2,8
<b>1,2,4,5,7-pentatiocano</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> S <sub>5</sub>	530	0.8 ± 0.1	-
<b>1,3,5,7,9-pentatiocano</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> S <sub>5</sub>	545	0.5 ± 0.0	1.2 ± 0.4
<b>1,2,5,6-tetratiocano</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S <sub>4</sub>	551	11.2 ± 1,1	0.4 ± 0.1
<b>lenthionina</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>5</sub>	597	-	10.2 ± 2.3
<b>hexatiepano</b>	CH <sub>2</sub> S <sub>6</sub>	685	-	1.1 ± 0.5
<b>sulfeto octatomico cíclico</b>	S <sub>8</sub>	006	-	3.4 ± 0.3
<b>TOTAL</b>			<b>77.2</b>	<b>76.4</b>

F.M: FORMULA MOLECULAR; <sup>A</sup>SUBSTÂNCIAS LISTADAS POR ORDEM DE ELUIÇÃO EM COLUMA ZB-5; <sup>B</sup>IDENTIFICAÇÃO: I R (ÍNDICE DE RETENÇÃO), GC-EM (CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTRO DE MASSA); <sup>C</sup>TEMPERATURA PROGRAMADA EM DETERMINADOS ÍNDICES DE RETENÇÃO EM COLUMA APOLAR ZB-5 (50-250 °C; 3 °C MIN<sup>-1</sup>).

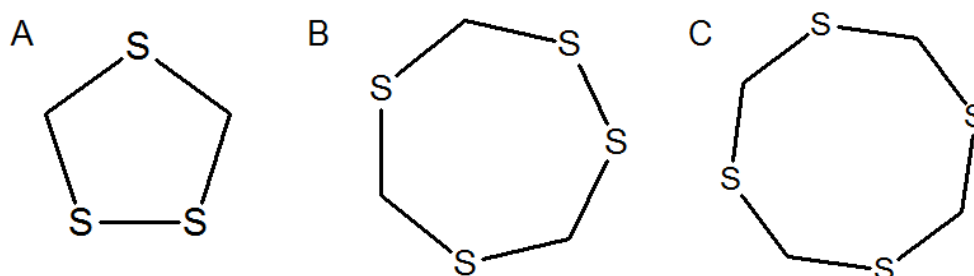


FIGURA 11. ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS 1,2,4-TRITIOLANO (A), 1,2,5,6-TETRATIOCANO (B) E 1,2,4,6-TETRATIEPANO (C) PRESENTES NOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE *M. foetidus*.  
FONTE: A AUTORA (2014).

Estas substâncias foram identificados por espectrometria de massa e comparação com os dados da literatura (ADAMS, 1995;). Com base nesta composição, a estes óleos podem ser atribuídos com o aroma de cebola pungente que é exalado pela planta, e que é responsável pelo seu nome popular (pau alho).

O óleo obtido hidrodestilação teve um rendimento de 0,84%, e possui uma cor amarela com odor característico. O método SMPE foi mais eficiente quando se considera a quantidade de substâncias identificadas e o tempo de obtenção do cromatograma (30 minutos), e pode simplificar consideravelmente o procedimento de preparação da amostra em comparação com o método de hidrodestilação. Por outro lado, quando combinado com GC/MS, proporciona as condições adequadas para a otimização e a identificação de um número maior de substâncias voláteis.

A presença de compostos contendo enxofre na composição do óleo, o torna um material bastante peculiar, em relação a composição química. A atividade anticancerígena de compostos sulfurados, já foi reportada na literatura (MIRON *et al.*, 2003), e a presença de polissulfetos cíclicos como 1, 2,4-trithiolane e 2,4,6-tetrathiepane, já foram relatados no extrato bruto de *Parkia sp.*

Polissulfetos cíclicos tem ocorrência restrita na natureza, existindo poucos relatos de ocorrências destes compostos em plantas. O perfil diferenciado da composição volátil obtida por diferentes métodos, hidrodestilação e SPME, pode sugerir a ocorrência de transformações químicas. O método que emprega

hidrodestilação na qual ocorre o contato direto entre o material vegetal e vapores de água, aqui pode estar contribuindo para promover reações posteriores com as moléculas e entre estes compostos cíclicos.

Através do método SPME foi possível identificar maior quantidade de polisulfetos, alguns destes ausentes na análise com o material obtido por hidrodestilação, como é o caso dos compostos lenthionine e ciclic octaatomic sulfúfur.

A presença de algumas substâncias com número elevado de átomos de enxofre e elevado peso molecular, identificados na extração por SPME e a ausência destas no processo de hidrodestilação, pode ser devido a transformações químicas provocadas pela ruptura das ligações entre os átomos de enxofre através do calor, a qual esta submetida a amostra no processo de hidrodestilação, levando a formação de compostos do tipo polisulfetos cíclicos de massa molecular menor.

O óleo possui em sua composição substâncias até então pouco comuns encontrados na composição química de óleos voláteis. A atividade anticancerígena de compostos sulfurados, já foi reportada na literatura (MIRON *et al.* 2003), e a presença de polissulfetos cíclicos como 1, 2,4-trithiolane e 2,4,6-tetrathiepane, já foram relatados no extrato bruto de *Parkia sp.*

## 5.5 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* E *M. foetidus*

A extração com solventes orgânicos em extrator de Soxhlet é considerado um processo eficiente e bastante utilizado. Com a utilização do Soxhlet, utiliza-se um volume pequeno de solvente, que fica sob aquecimento e a todo o momento em contato com a amostra promovendo uma maior interação entre sólido-líquido (PAIVA *et al.*, 2004). Os rendimentos estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

O rendimento do extrato etanólico bruto obtido a partir do material vegetal seco de *A. extraaxillaris* foi de 12,53. Foram obtidos 27,8 g de extrato etanólico bruto de *A. extraaxillaris*. Destes, foram retirados 10,25g do extrato bruto para realização

das atividades biológicas, sendo o restante utilizado no particionamento para obtenção das frações.

Para a espécie *M. foetidus*, o rendimento do extrato etanólico bruto foi de 23,45% para as folhas, 37,81% para as cascas, 19,27% para os frutos e 18,72% para as sementes. Foram obtidos 177,9 g de extrato bruto das folhas, 238,5 g para as cascas, 56,7 g para os frutos e 41,2 g para as sementes. Destes, 20,5 g das folhas, 40,7 das cascas, 5,8 dos frutos e 4,5 das sementes foram separados para as atividades biológicas.

TABELA 6. RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* OBTIDOS POR SOHXLET.

	MASSA SECA OBTIDA (g)	<sup>1</sup> RENDIMENTO (%) EM RELAÇÃO À MASSA
<b>EEB*</b>	52,49	12,53
<b>FH*</b>	13,77	26,23
<b>FCL*</b>	16,12	30,86
<b>FAE*</b>	23,5	44,77

\*NOTA: EEB: EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FH: FRAÇÃO HEXÂNICA, FCL: FRAÇÃO CLOROFÓRMIA, FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

TABELA 7. RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS DIFERENTES PARTES MORFOLÓGICAS DE *M. foetidus*.

FOLHAS		
	MASSA SECA OBTIDA (G)	RENDIMENTO (%) EM RELAÇÃO À MASSA
<sup>1</sup> EEB	88,67	23,45
<sup>1</sup> FH	32,45	36,59
<sup>1</sup> FCL	25,67	28,95
<sup>1</sup> FAE	18,82	21,22
CASCAS		
<sup>1</sup> EEB	123,48	37,81
<sup>1</sup> FH	46,73	37,84
<sup>1</sup> FCL	32,19	26,06
<sup>1</sup> FAE	23,31	18,88
FRUTOS		
<sup>1</sup> EEB	33,48	19,27
<sup>1</sup> FH	9,72	29,03
<sup>1</sup> FCL	16,72	49,94
<sup>1</sup> FAE	12,29	36,70
SEMENTES		
<sup>1</sup> EEB	43,28	18,72
<sup>1</sup> EH	25,21	58,25
<sup>1</sup> ECL	8,23	19,02
<sup>1</sup> EAE	5,14	11,88
<sup>1</sup> EM	28,72	66,36

\*NOTA: EEB: EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FH: FRAÇÃO HEXÂNICA, FCL: FRAÇÃO CLOROFÓRMIA, FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, EH: EXTRATO HEXÂNICO, ECL: EXTRATO CLOROFÓRMIO, EAE: EXTRATO ACETATO DE ETILA, EM: EXTRATO METANÓLICO.

O método de extração utilizado foi por aparelho de Soxhlet, pois as temperaturas de trabalho máximas não ultrapassam 60°C, prevenindo a alta degradação térmica. Isso ocorre por solvatação da amostra pelo solvente, e por se tratar de um sistema fechado, a perda de componentes voláteis é menor em comparação a outros métodos, como infusão e decocção.

Este aparelho é importante também na economia dos solventes utilizados no processo, uma vez que a extração é feita com refluxo, promovendo o reaproveitamento do solvente (CARVALHO, 2001). Este método garante, ainda, reprodutibilidade do extrato vegetal, tanto no caráter químico, quanto no biológico, desde que a produção e coleta do material vegetal estejam padronizadas, pois a

reprodução das atividades biológicas de interesse depende diretamente da composição química do extrato ou fração.

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE *Microlobius foetidus*

O cromatograma obtido a partir do Extrato hexânico das sementes de *M. foetidus* (figura 12), tornou possível a identificação de 5 substâncias, representadas por 66,8% de ácidos graxos saturados e 18,43% de ácidos graxos insaturados, como observado na figura 37. Os ácidos graxos saturados identificados nesta fração são os ácido láurico (1,8%), Heptadecanóico (7,6%), sendo o esteárico (57,4%) o constituinte majoritário. Os ácidos graxos insaturados são compostos de *cis*-10-Pentadecenoico encontrado em maior concentração (10,1%), seguido pelo ácido *cis*-10-Heptadecenóico (8,33%) como demonstrado na tabela 8.

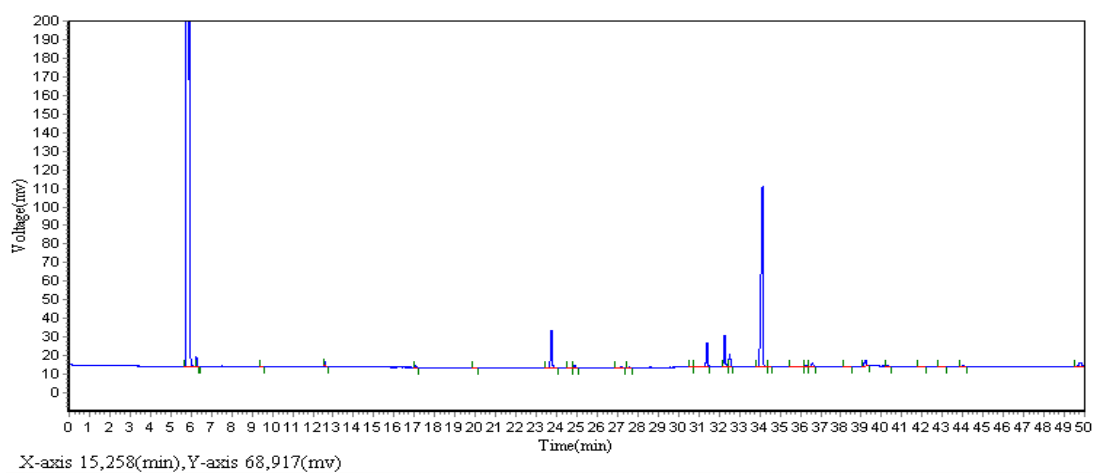


FIGURA 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO PARA ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO HEXÂNICO (EH) OBTIDO DAS SEMENTES DE *Microlobius foetidus*.

TABELA 8. PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Microlobius foetidus*.

Fórmula estrutural	Ácido graxo	Percentual (%)
C12:0	Láurico	1,8
C15:1	<i>cis</i> -10-Pentadecenoico	10,1
C17:0	Heptadecanóico	7,6
C17:1	<i>cis</i> -10-Heptadecenóico	8,33
C18:0	Estearico	57,4
<b>Total identificado</b>		<b>85,03</b>
<b>Ácidos graxos insaturados</b>		<b>18,43</b>
<b>Ácidos graxos saturados</b>		<b>66,8</b>

A abundância de ácido esteárico já foi reportada para outras espécies de leguminosas, dentre elas são citadas *Senna occidentalis* (SCHMEDA-HIRSCHMANN; ARIAS 1992), *Platymiscium floribundum* (VALLILO *et al.*, 2007) e *Amburana cearensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2011), demonstrando que essa substância é encontrada nas diferentes subfamílias de Fabaceae, onde acúmulo de ácido esteárico em sementes de leguminosas está diretamente relacionado a conversão parcial em amido, uma vez que as outras substâncias energéticas como lipídios do próprio eixo embrionário são os primeiros produtos de reserva utilizados na germinação (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, há relatos de que o ácido esteárico pode atuar como repelente de mosquitos adultos, sendo esse efeito semelhante a outros ácidos de cadeia longa como o ácido decanóico e ácido tridecanóico (ALI; CANTRELL; BERNIER, 2012).

## 5.7 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Asemeia extraaxillaris* E *Microlobius foetidus*

A partir das absorvâncias da quercetina e ácido gálico nas concentrações já citadas, foram traçadas curvas analíticas de calibração para o teor de fenóis e flavonóides (figura 13). As concentrações foram expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de quercetina e ácido gálico.

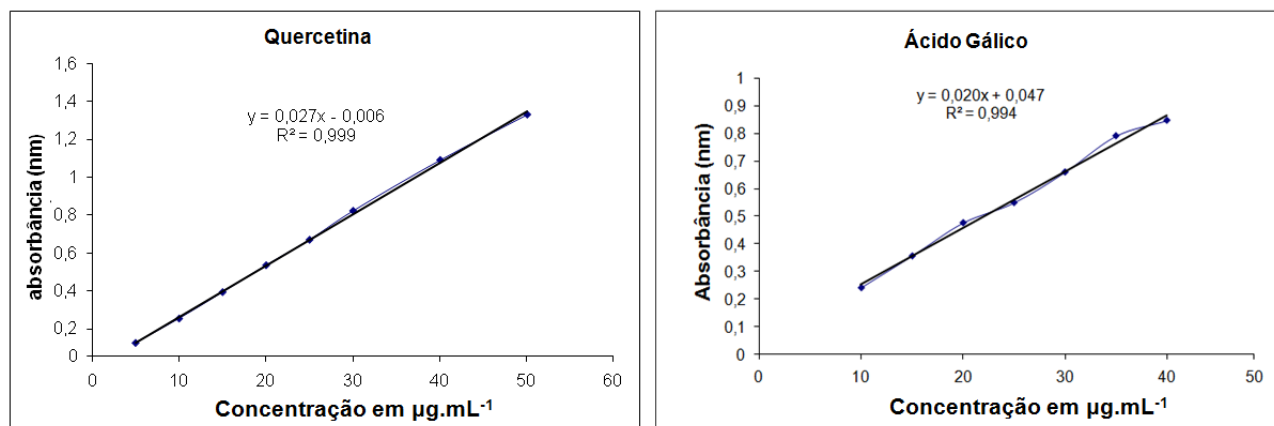


FIGURA 13. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA PARA ANÁLISE DE FLAVONÓIDES, E ÁCIDO GÁLICO PARA ANÁLISE DE FENÓIS TOTAIS.  
FONTE: A AUTORA (2013).

Nos testes químicos preliminares, foi verificada a presença de flavonóides e fenóis, nos extratos e frações testados. Para a espécie *A. extraaxillaris*, foi possível detectar a presença de flavonóides e fenóis totais. A FAE apresentou maior concentração de flavonóides ( $79,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina), onde concentrações similares foram verificadas para o EEB ( $47,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina), FCL ( $46,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina) e FR ( $43,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina). Para a fração hexânica, a concentração de flavonóides não foi considerada significativa em relação às demais (tabela 9).

Fenóis totais também foram observados no EEB e frações. Assim como observado no conteúdo de flavonóides, foi verificado maior teor no conteúdo de fenóis totais na FAE ( $83,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ /ácido gálico). Concentração acentuada também foi observada para a FCL ( $75,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de ácido gálico) e FR ( $75,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de ácido gálico) (tabela 9).



TABELA 9. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*.

Extrato	Flavonóides $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ equivalentes de quercetina)	Fenóis totais $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico)
<sup>1</sup> EEB	47,37 $\pm$ 0,7a	56,4 $\pm$ 1,33a
<sup>1</sup> FH	2,12 $\pm$ 0,5b	8,7 $\pm$ 1,81b
<sup>1</sup> FCL	46,44 $\pm$ 0,2a	75,27 $\pm$ 2,6c
<sup>1</sup> FAE	79,73 $\pm$ 1,26c	83,2 $\pm$ 1,8d
<sup>1</sup> FR	43,5 $\pm$ 0,9a	75,2 $\pm$ 1,5e

<sup>1</sup> VALORES SEGUIDOS DE LETRAS SEMELHANTES NA MESMA COLUMNA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Duarte e Colaboradores, (2008) relata uma baixa concentração de fenóis e flavonóides na espécie *Asemeia sabulosa*. O mesmo autor relata que a presença de escopoletina e três flavonóides que são encontrados na espécie como metabólitos minoritários são responsáveis pela detecção de compostos fenólicos e flavonóides.

Estudos anteriores realizados com a espécie *A. sabulosa* revelaram a presença de pequenas quantidades de três flavonóides: quercetina, apigenina e uma quercetina glicosilada. A presença da quercetina foi descrita anteriormente para outras espécies do gênero *Polygala*, tais como *A. caudata* (LIN *et al.*, 2005) e *A. sabulosa* (PIZZOLATTI *et al.*, 2000). Já a ocorrência dos outros flavonóides em *A. sabulosa* foi descrita pela primeira vez no gênero (PIZZOLATTI *et al.*, 2008). O potencial antioxidante destes compostos já está bem relatado na literatura.

Para a espécie *M. foetidus*, foi verificado que o teor de fenóis e flavonóides variou em função da parte morfológica e fração testada. As maiores concentrações de flavonóides foram observadas para a FAE das folhas (66,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina) e frutos (71,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de quercetina), sendo concentrações relativamente baixas observadas no EEB e frações das cascas (tabela 10). Na concentração de fenóis totais as maiores concentrações foram obtidas para a FAE das folhas (72,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de ácido gálico) e frutos (67,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  equivalentes de ácido gálico). Uma baixa concentração de flavonóides foi observada para os extratos e frações das folhas. Apesar da baixa concentração

de flavonóides, a alta concentração de compostos fenólicos nas cascas pode ocorrer em decorrência de outros componentes fenólicos e não flavonóides (tabela 10).

TABELA 10. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus*.

Extrato	Flavonóides ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ equivalentes de Quercetina)	Fenóis totais ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico)
<b>FOLHAS</b>		
EEB	43,3 $\pm$ 1,12a	58,9 $\pm$ 1,17a
FH	3,4 $\pm$ 0,9b	6,6 $\pm$ 0,36b
FCL	6,5 $\pm$ 1,18b	12,3 $\pm$ 0,89b
FAE	66,3 $\pm$ 1,26c	72,9 $\pm$ 1,17c
FR	32,1 $\pm$ 1,89d	43,3 $\pm$ 1,55d
<b>CASCAS</b>		
EEB	21,3 $\pm$ 1,17a	58,9 $\pm$ 2,12a
FH	5,6 $\pm$ 1,29b	2,9 $\pm$ 1,78
FCL	8,2 $\pm$ 1,88b	12,3 $\pm$ 1,98
FAE	25,4 $\pm$ 1,12a	55,2 $\pm$ 2,87
FR	18,9 $\pm$ 1,42c	31,2 $\pm$ 1,17
<b>FRUTOS</b>		
EEB	82,1 $\pm$ 1,27a	86,2 $\pm$ 2,16a
FH	1,2 $\pm$ 1,12b	2,5 $\pm$ 1,27b
FCL	48,9 $\pm$ 2,23c	55,9 $\pm$ 0,29c
FAE	71,2 $\pm$ 0,78d	67,4 $\pm$ 1,13a
FR	44,8 $\pm$ 1,17c	48,1 $\pm$ 0,78d

<sup>1</sup> VALORES SEGUIDOS DE LETRAS SEMELHANTES NA MESMA COLUNA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05).

A presença de fenóis e flavonóides na fração acetato de etila já foram descritos para outras espécies da família Mimosoideae. Em estudos com a espécie *Acacia podalyriifolia* Andrade e Colaboradores (2005), verificaram alta concentração de substâncias fenólicas e flavonóides.

A atividade antioxidante observada na FAE das espécies em estudo pode estar associada a presença de flavonóides e fenóis totais. SANTOS *et al.*, 1998 avaliaram a atividade antioxidante de flavonóides e observaram que a presença dos grupos estruturais o- dihidroxil no anel B, dupla ligação no anel C2 e C3 em conjugação com a função 4-oxo e a presença adicional de grupos hidroxila nos C3 e C5 (com exceção da quercetina e a 3'-O-metil-quercetina) foram os mais potentes inibidores da peroxidação lipídica utilizando mitocôndria como fonte de lipídio. Essa

atividade antioxidante se deve também à quelação do Fe, o que pode explicar a atividade de flavonóides e de polifenóis que não possuem grupos estruturais descritos acima (OZGOVÁ; HERMÁNEK; GUT, 2003).

Muitas substâncias naturais, obtidas das plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas (GÜLCIN *et al.*, 2003). As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como eficientes captadores radicalares (GYAMFI *et al.* 1999; KUJALA *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2001; SALLEM *et al.*, 2001; THALANG *et al.*, 2001; AL-MAMARY *et al.*, 2002; MIHARA *et al.*, 2005; MEDA *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005).

Os efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos provêm de sua capacidade de transferir elétrons aos radicais livres, estabilizando-os, além de possuírem ação quelante de íons metálicos, ativarem enzimas antioxidantes, reduzirem radicais livres derivados do tocoferol e de inibir as oxidases (HALLIWELL, 2008; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Assim, a determinação do conteúdo de flavonóides na espécie foi realizada através do método da complexação com o reagente  $AlCl_3$ . Este agente complexante forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonóides, proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorbâncias do espectro de UV/vis (WOISKY; SALATINO, 1998).

O método colorimétrico com cloreto de alumínio, cujo princípio baseia-se na formação de um complexo estável entre o cloreto de alumínio com o C4 do grupo ceto e os grupos hidroxila dos carbonos C3 e C4 de flavonas e flavonols (CHANG *et al.*, 2002). A formação do complexo é vantajosa na análise espectrofotométrica, pois além de permitir um desvio para maiores comprimentos de onda, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas, também causa uma intensificação da absorção (WOISKY, 2006).

No entanto, a estimativa do teor de flavonóides totais pode estar subestimada na amostra, pois outros flavonóides com estruturas diferentes que não são detectados por esse método como a flavanona isosakuranetina tem sido detectados na análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Os polifenóis são responsáveis pela maior parte da capacidade antioxidante na maioria dos produtos derivados de plantas e, desta forma, sua determinação é de suma importância na caracterização de extratos. O método utilizado foi o de Folin Ciocalteu, que é capaz de determinar simples derivados do benzeno, bem como hidroxinamatos, tocoferols e flavonóides presentes em plantas e alimentos, além de também ser capaz de determinar derivados de tirosina e DOPA em produtos animais e aditivos como propil galato em alimentos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMULA-RAVENTÓS, 1999).

## 5.8 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

### 5.8.1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **a1**

Da fração acetato de etila de *A. extaxillares*, dos frascos da coluna 181 a 185 foi isolado o composto Canferol-3  $\beta$  -D- glucose, cuja estrutura está demonstrada na figura 14. Para a identificação, foram realizados os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, em um equipamento Bruker de 200MHz, operando a 4,7 Teslas. O espectro de  $^1\text{H}$  está disposto na figura 15, e apresentou sinais característicos de um flavonóide glicosilado. O sinal em 12,62 ppm é característico de OH ligado ao carbono 5, realizando ponte de hidrogênio com a carbonila do carbono 4. O dubleto de 6,22ppm e contante de acoplamento de  $J$  1,85 indica que este hidrogênio está acoplado em meta com o hidrogênio em 6,45, também dubleto, de constante de acoplamento de  $J$  1,85 conforme indica a ampliação do espectro de hidrogênio nas figuras 16 e 17. Observa-se também a presença de um anel para substituído, confirmado pelos sinais característicos em 8,05ppm e 6,89ppm, destacados na figura 17.

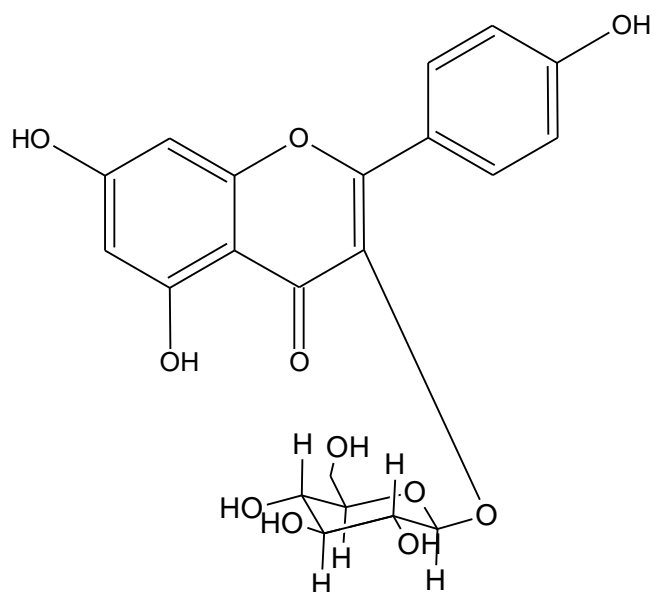


FIGURA 14. ESTRUTURA DO CANFEROL-3 -B -D- GLUCOSE

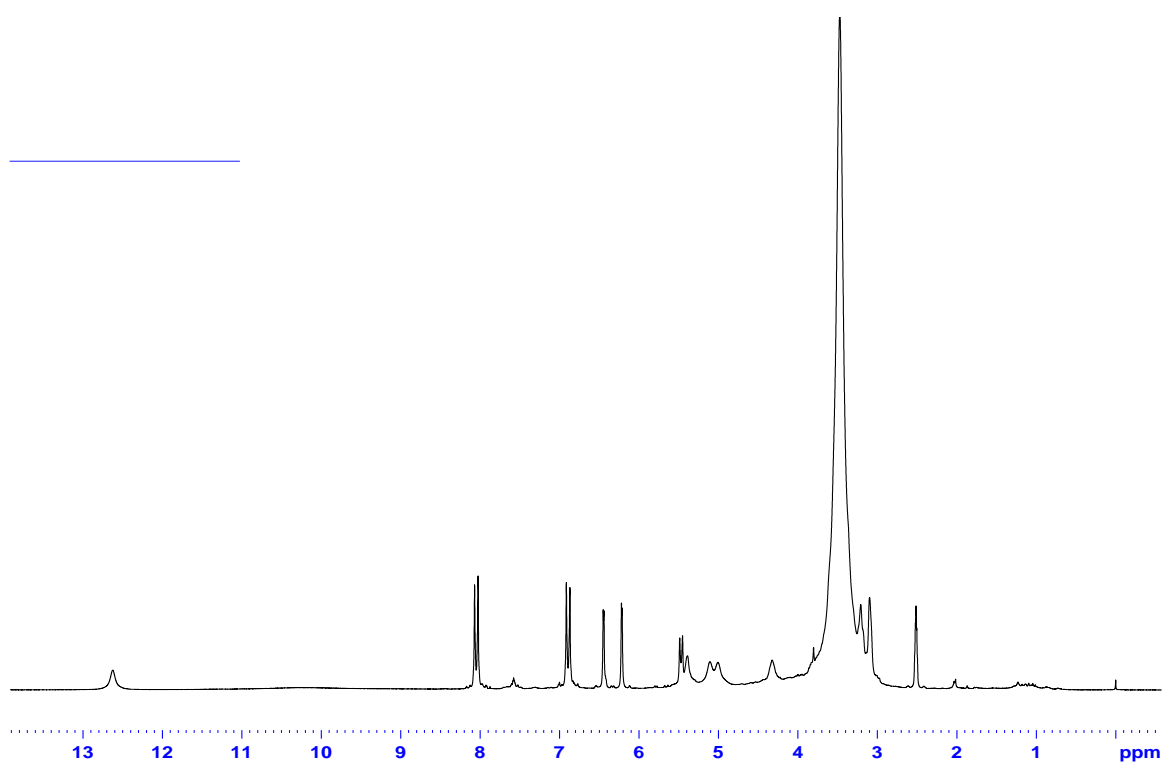


FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO – d<sub>6</sub>).

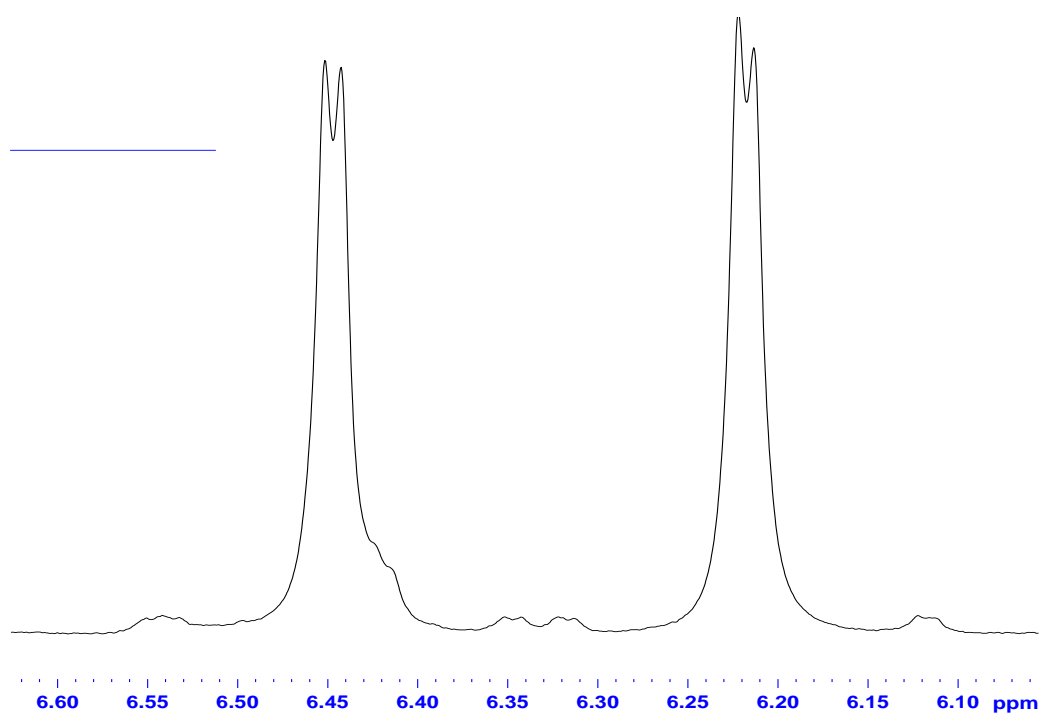


FIGURA 16. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN- $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO – d6).

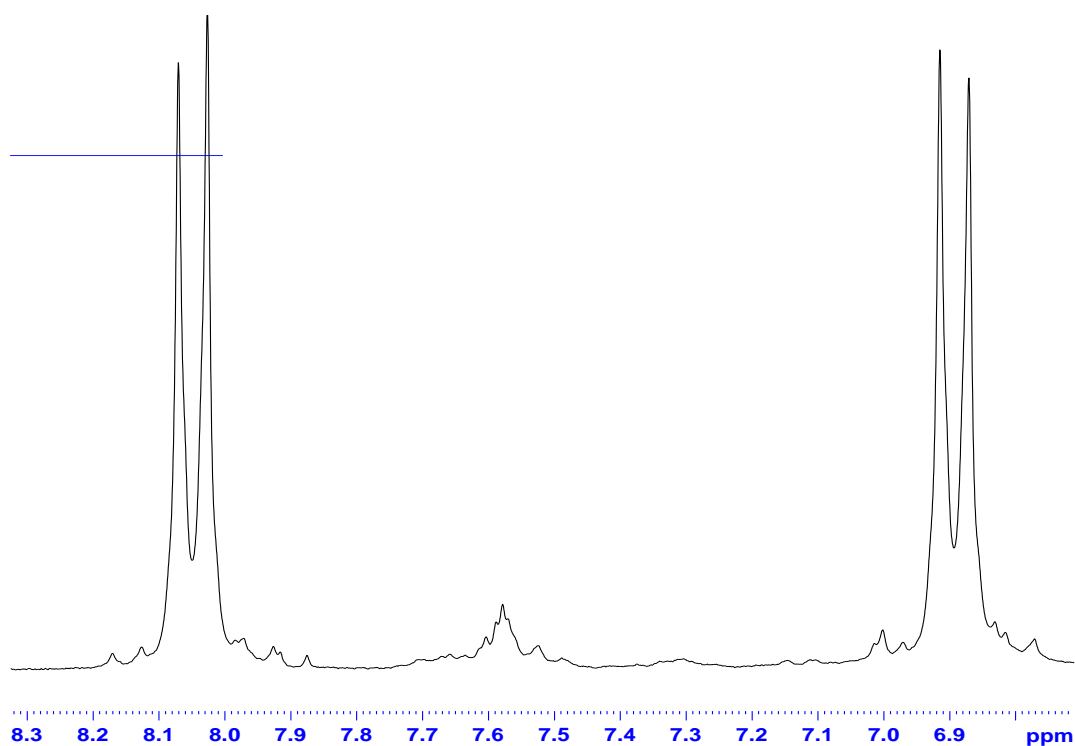


FIGURA 17. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN- $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO – d6).

Além disso, há a presença de um dubleto em 5,47ppm com constante de acoplamento de  $J$  7,2, que indica a presença de um açúcar, a glicose. Porém os demais sinais do açúcar encontram-se na região de 3 a 4 ppm, sobrepostos pelo sinal da água, o que impede a visualização de tais sinais. A presença do açúcar, porém foi confirmada pela realização do experimento de  $^{13}\text{C}$ , que originou o espectro disposto na figura 18.

O experimento de DEPT135, cujo espectro está demonstrado a seguir, auxiliou na identificação do  $\text{CH}_2$  em 60,9ppm. Neste experimento os carbonos quaternários não aparecem e o  $\text{CH}_2$  encontra-se abaixo da linha de base. O experimento permitiu determinarmos que o carbono em 104,1 ppm é o carbono 10, um carbono quaternário, que não apareceu no DEPT135 e que o carbono 1'' é o sinal em 101,0 ppm, uma vez que este carbono apareceu no experimento de DEPT135 (figura 19).

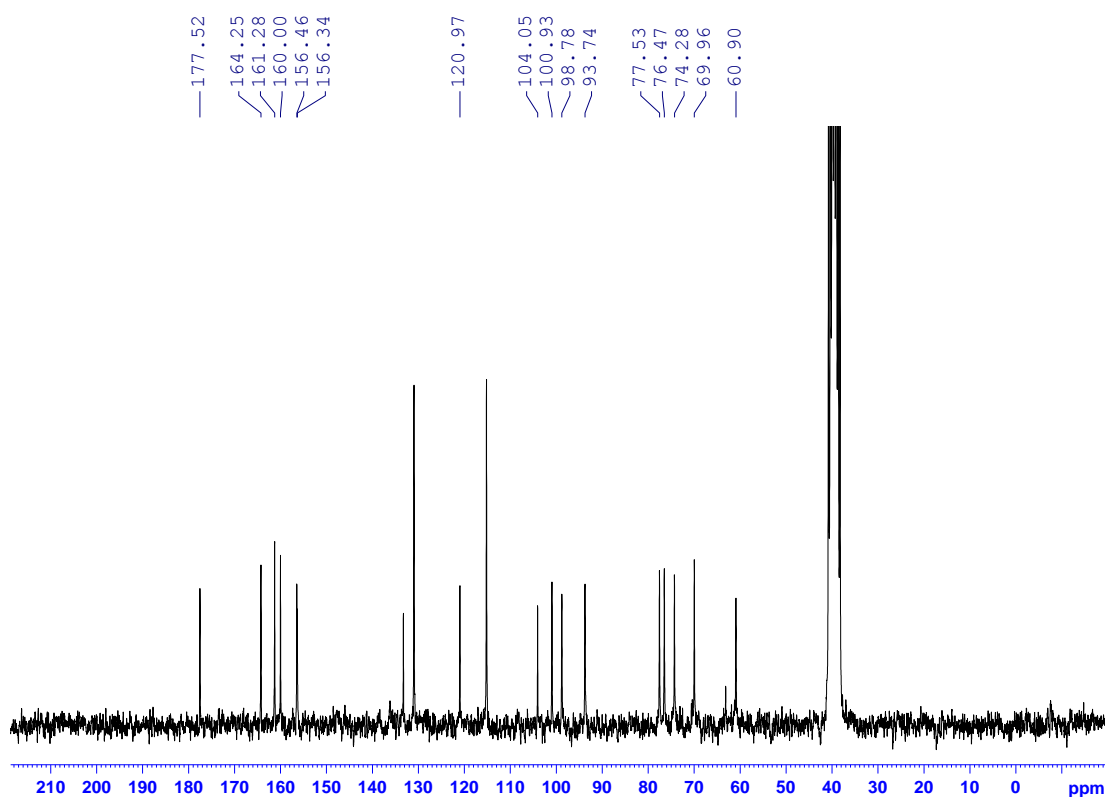


FIGURA 18. ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO -d6).

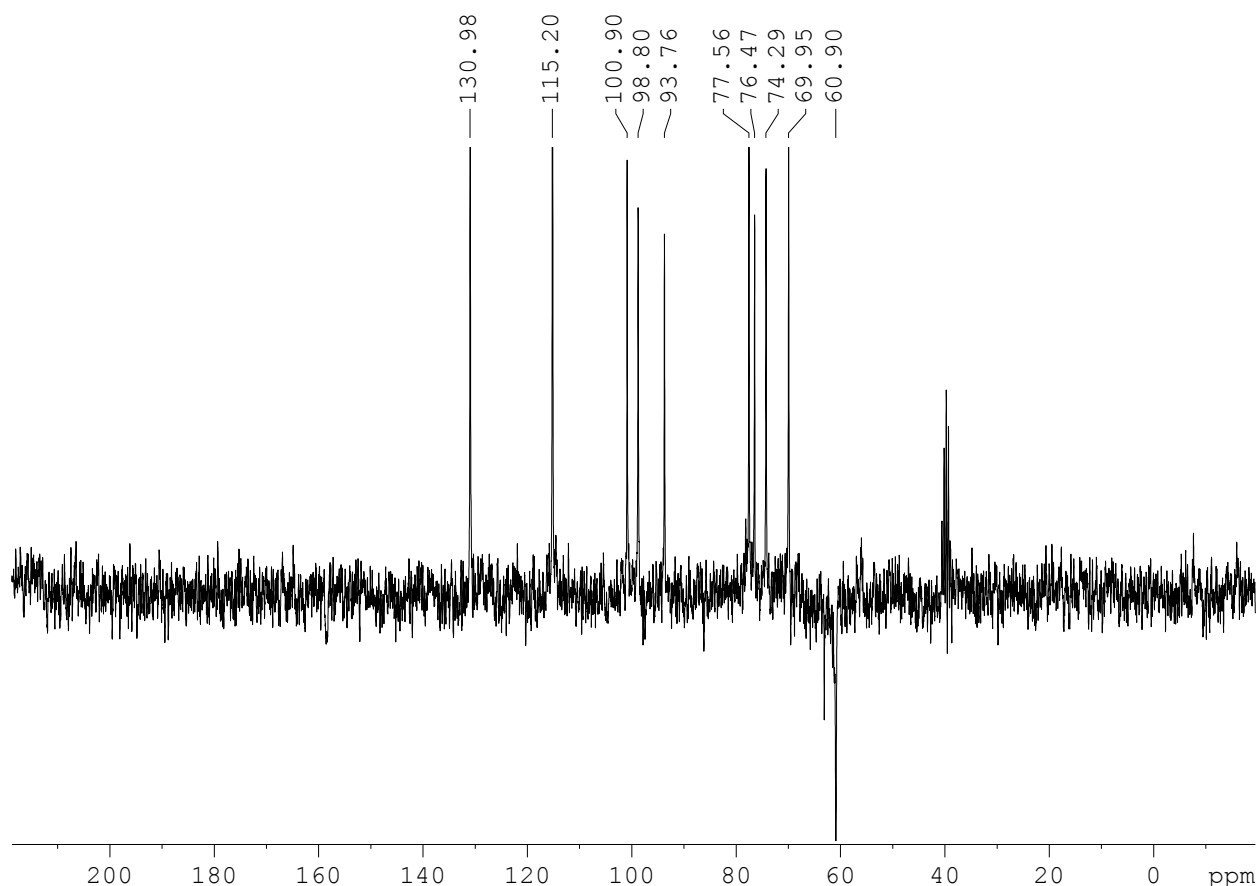


FIGURA 19. ESPECTRO DE DEPT135 DA SUBSTÂNCIA A1 (200MHz, DMSO -d6).

Após comparação com a literatura confirmou-se que se trata da substância Canferol3 - $\beta$  -D- glicose, pela similaridade com os sinais encontrados por Sikorska e Matlawska (2001), de acordo com os dados da tabela 11.

A literatura reporta que o Canferol3 - $\beta$  -D- glucose possui alto potencial antioxidante, evidenciado pelo sequestro de radicais livres, pelo método do DPPH (OKAWA, *et al.*, 2001; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2006), e que nas concentrações de  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M promoveu um efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídas com fenilefrina 10mM, apresentando um efeito máximo em torno de  $65,48 \pm 5,86$  % (SILVA *et al.*, 2005)



TABELA 11. COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN<sup>13</sup>C E <sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA **a1** E LITERATURA EM DMSO-d<sub>6</sub>

Carbono	Amostra <sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	Referência (SIKORSKA & MATLAWSKA, 2001)
2		156,5	156,2
3		133,3	133,6
4		177,5	177,0
5	OH - 12,62 s	161,3	161,8
6	6,22 d ( <i>J</i> 1,85)	98,8	98,5
7		164,2	163,7
8	6,45 d ( <i>J</i> 1,85)	93,7	93,5
9		156,3	156,2
10		104,1	104,4
1'		121,0	120,8
2'	8,05 m	131,1	130,6
3'	6,89 m	115,2	114,9
4'		160,0	159,5
5'	6,89 m	115,2	114,9
6'	8,05 m	131,1	130,6
1''	5,47 d ( <i>J</i> 7,2)	101,0	104,1
2''		74,3	74,5
3''		76,6	76,5
4''		70,0	70,0
5''		77,5	77,1
6''		60,9	60,1

FONTE: A AUTORA (2014)

Através da comparação entre estes valores, pode-se afirmar que o trata-se da beta glucose, já que o valor da constante de acoplamento de H'' é de 7,2, compatível com a beta glucose. Além dos valores dos carbonos do açúcar estão também compatíveis com os valores da beta glucose.

#### 5.8.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS **m1** E **m2** PRESENTES NA AMOSTRA **m35**.

Da amostra **m35**, da fração acetato de etila dos frutos de *M. foetidus*, foram identificadas duas substâncias, sendo **m1** a substância catequina e **m2** a dihidrobinetina, embora existam outros sinais proporcionalmente menores que indicam ainda a presença de outras substâncias as quais não foram identificadas. Para elucidação das estruturas, foram realizados os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 20) e os experimentos bidimensionais de Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) – figura 21- e Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) – figura 22. Os espectros foram obtidos em um equipamento Bruker, 600MHz, operando à 14,7 Tesla.

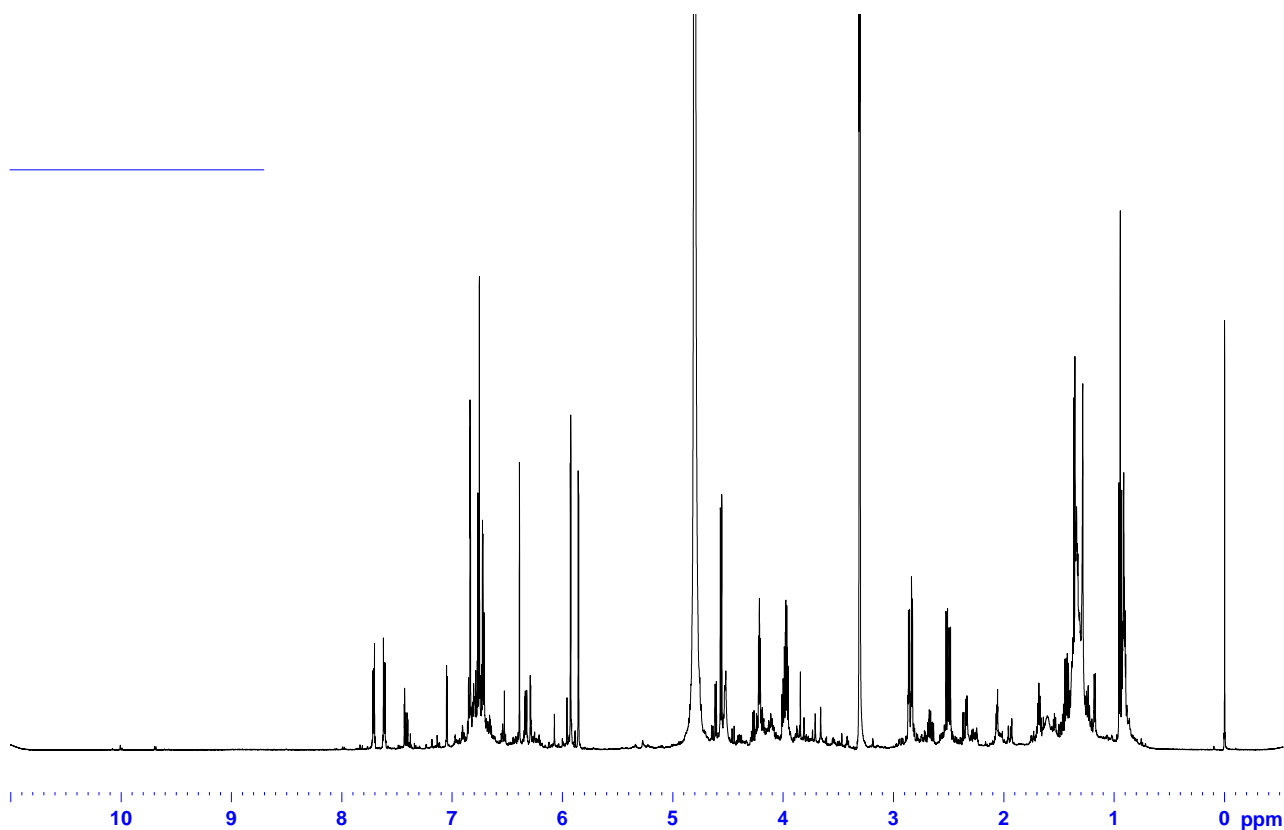


FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA **m35** (600MHz, MeOD).

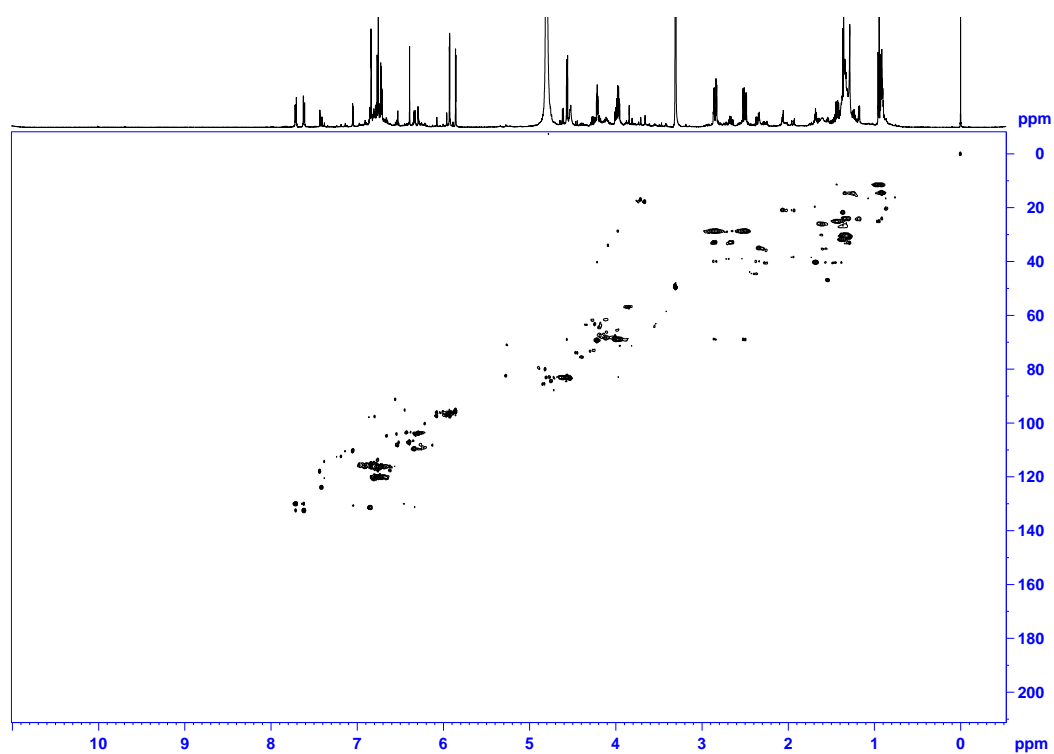


FIGURA 21. ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA m35 (600MHz, MeOD)

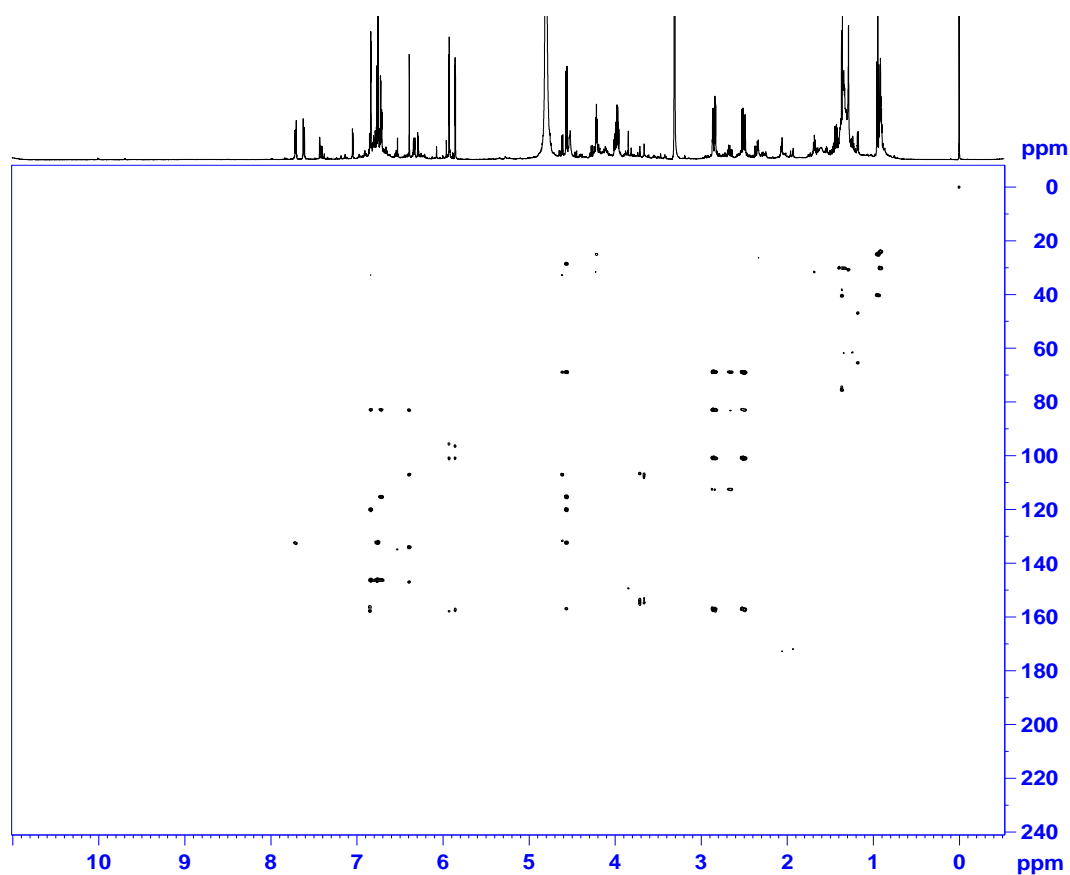


FIGURA 22. ESPECTRO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA m35 (600MHz, MeOD)

### 5.8.2. SUBSTÂNCIA **m1**

A substância **m1** se encontra em maior quantidade na amostra, sendo identificada como a catequina (figura 23). No espectro de hidrogênio, possui dois dubletos em 5,85ppm e em 5,95ppm, acoplando entre si com constante de  $J$  2,3, evidenciando também a correlação direta destes hidrogênios com os carbonos em 95,5ppm e 96,5ppm, respectivamente (figura 24).

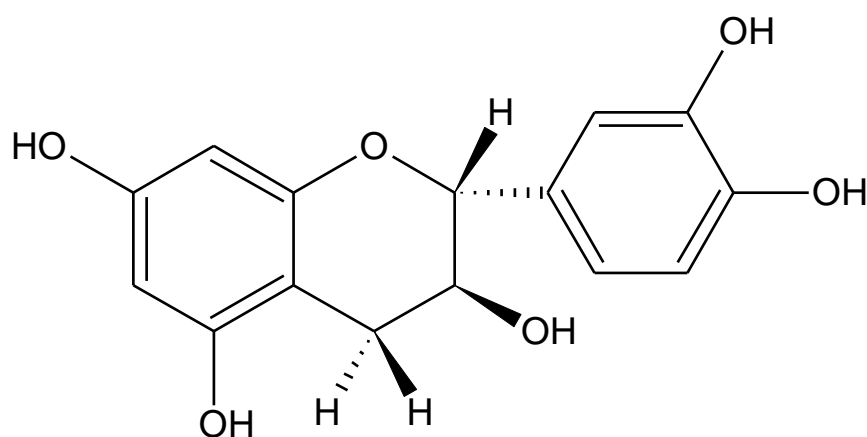


FIGURA 23. ESTRUTURA DA CATEQUINA IDENTIFICADA NA AMOSTRA **m35**, DENOMINADA **m1**.  
FONTE: A AUTORA (2014)

Do mesmo modo, a figura 25 mostra as correlações diretas dos hidrogênios em 6,72 ppm, 6,76 ppm e 6,84 ppm, com suas correlações diretas com os carbonos em 120,1 ppm, 116,2 ppm e 115,4 ppm, respectivamente.

O dubleto em 4,56 ppm possui correlação direta no HSQC com o carbono em 82,9ppm e está acoplando com constante de  $J$  7,5 com o duplo duplo dubleto em 3,97 ppm, hidrogênio este que está ligado diretamente ao carbono em 68,9 ppm e cujas demais constantes de acoplamento de  $J$  8,2 e  $J$  5,4 indicam que há mais dois hidrogênios ligados a um carbono vizinho. São eles o duplo dubleto em 2,50 ppm ( $J$  16,1 : 8,2) e o, também duplo dubleto, em 2,85 ppm ( $J$  16,1 : 5,4), ambos ligados ao carbono em 28,6 ppm, conforme mostra a figura 26.

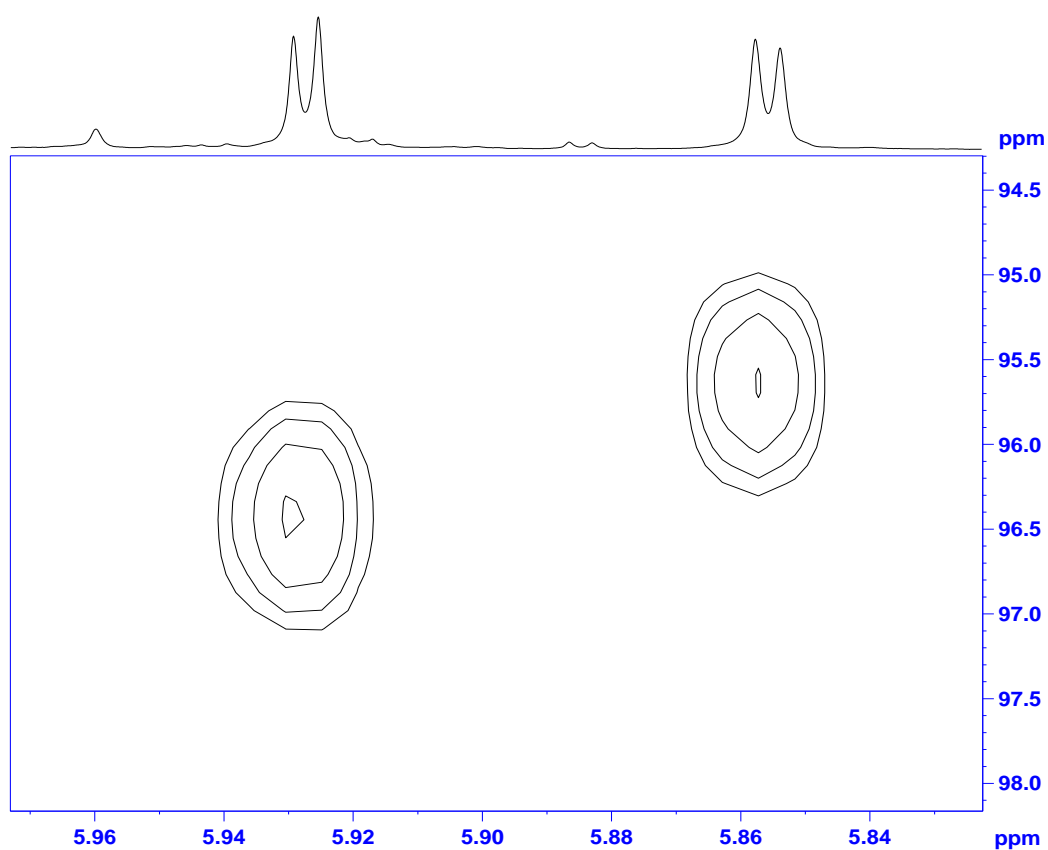


FIGURA 24. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M1, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 5,95 ppm E EM 5,85 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).

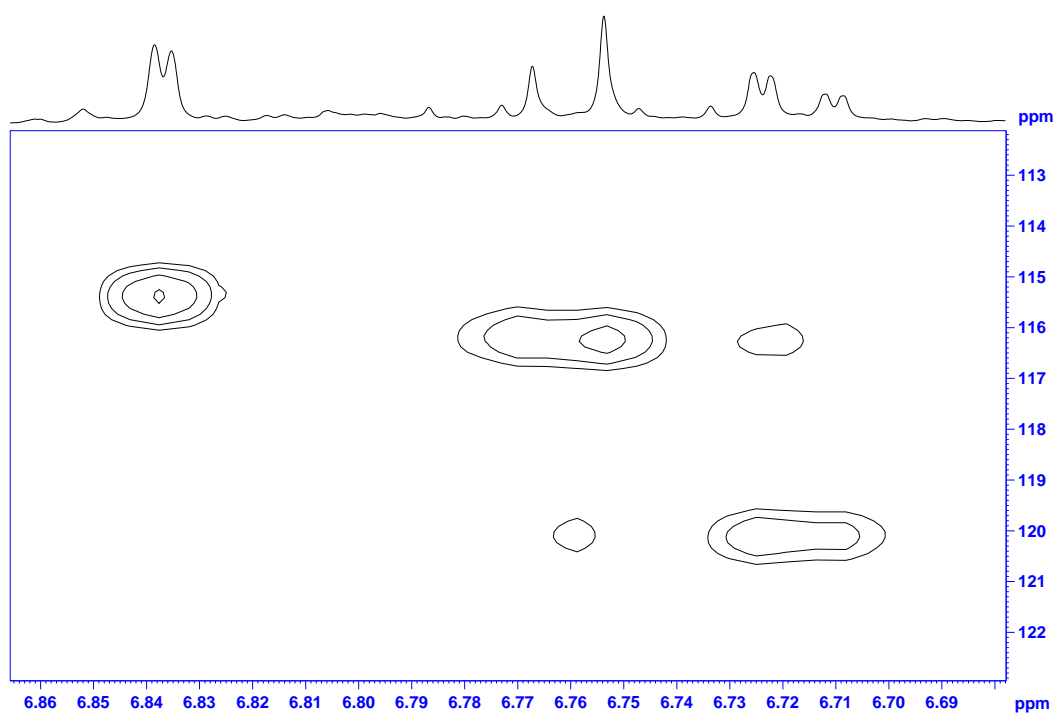


FIGURA 25. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M1, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 6,76 ppm e EM 6,84 ppm E O DUPLO DUBLETO EM 6,72 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).

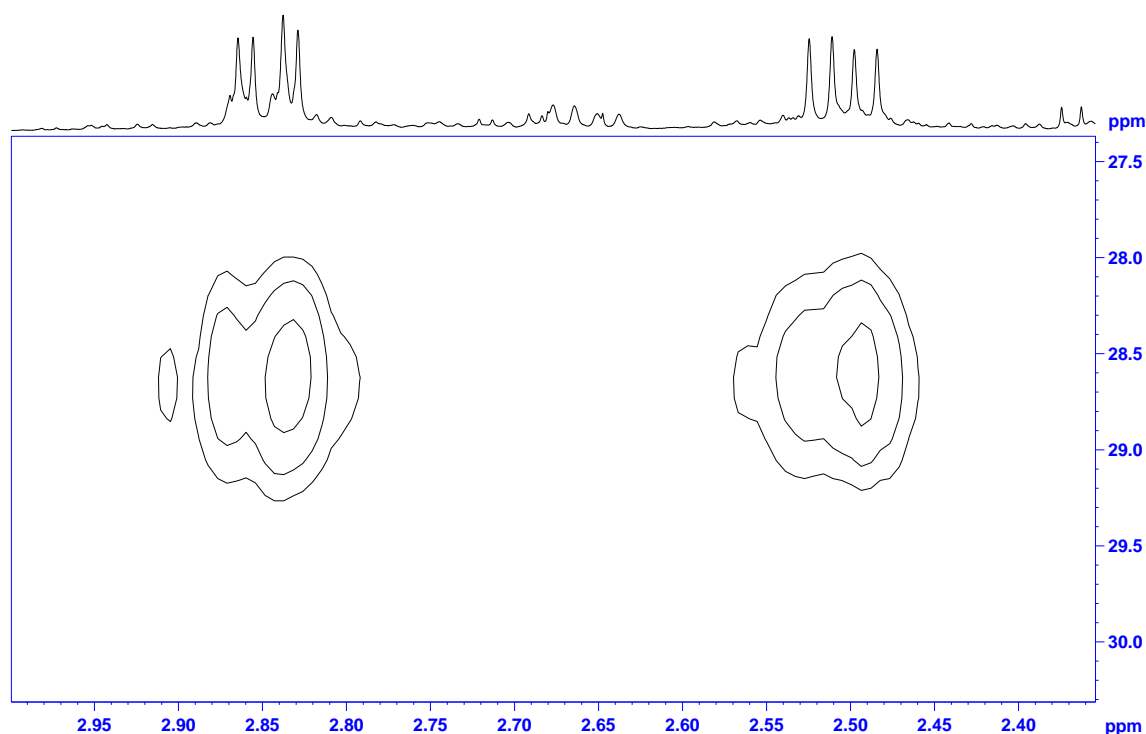


FIGURA 26. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M035, MOSTRANDO OS DUPLO DUBLETOS EM 2,50 ppm e EM 2,85 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).

Através da análise do espectro de HMBC da amostra **m35** pôde-se chegar aos valores dos demais carbonos pertencentes à estrutura da catequina. Tais valores foram comparados com a literatura, como demonstrado na tabela 12, confirmando a proposta da estrutura molecular.

Catequinas são descritas na literatura como flavonóides que apresentam uma série de atividades biológicas, como antioxidantes, quimioprotetora, antiinflamatória e anticarcinogênica (SCHMITZ *et al.*, 2005). após a administração oral das quatro principais catequinas (epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina, e epigalocatequina galato), em forma de chás em ratos, foi observado que as mesmas são absorvidas no intestino delgado e depois sujeitas a várias reações no fígado, levando a diversas formas conjugadas (OKUSHIO *et al.*, 1996) em humanos, os níveis de catequinas no plasma podem atingir seu pico 2 a 4 horas após a ingestão, e estudos mostram que após absorção no intestino, cerca de 70 a 80% das

catequinas ingeridas passam para a circulação, sendo 90% metiladas, sulfatadas ou conjugadas com ácido glicurônico no fígado, permanecendo de 2 a 5% delas intactas na circulação (HIGDON; FREI, 2003).

TABELA 12. DEMONSTRATIVO DOS VALORES DE HIDROGÊNIO E CARBONO OBTIDOS PARA A SUBSTÂNCIA CATEQUINA E COMPARAÇÃO COM OS VALORES ENCONTRADOS NA LITERATURA (600MHz, MeOD).

CARBONO	CATEQUINA (AMOSTRA M035)		LÔBO <i>et al</i> , 2008	
	<sup>1</sup> H	<sup>3</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>3</sup> C
1				
2	4,56 d (J 7,5)	82,9	4,57 d (J 7,5)	82,4
3	3,97 ddd (J 8,2: 7,5: 5,4)	68,9	3,97 m	68,0
	2,50 dd (J 16,1: 8,2)		2,51 dd (J 16,1 : 8,2)	
4	2,85 dd (J 16,1: 5,4)	28,6	2,85 dd (J 16,1 : 5,5)	28,3
5		157,1		156,6
6	5,95 d (J 2,3)	96,5	5,93 d (J 2,2)	96,0
7		157,9		157,5
8	5,85 d (J 2,3)	95,5	5,85 d (J 2,2)	95,1
9		156,9		157,0
10		100,9		100,3
1'		132,3		131,7
2'	6,84 d (J 2,0)	115,4	6,83 d (J 1,8)	115,2
3'		146,1		145,5
4'		146,2		
5'	6,76 d (J 8,1)	116,2	6,76 d (J 8,1)	115,6
6'	6,72 dd (J 8,1:2,0:0,5)	120,1	6,71 dd (J 8,1: 1,8)	119,8

FONTE: A AUTORA (2014)

### 5.8.2.2 SUBSTÂNCIA m2

A segunda substância, denominada **m2**, se mostrou presente em menor quantidade na amostra e a substância dihidrobinetina (figura 27), foi identificada. O espectro de hidrogênio, possui dois dubletos em 6,29 ppm (*J* 2,5) e em 6,84 ppm (*J* 8,2), além de um duplo dubleto em 6,33 (*J* 8,2 : 2,5), (figura 28). A figura mostra também a correlação direta destes hidrogênios com os carbonos em 103,6 ppm, 131,4 ppm e 109,7 ppm, respectivamente.

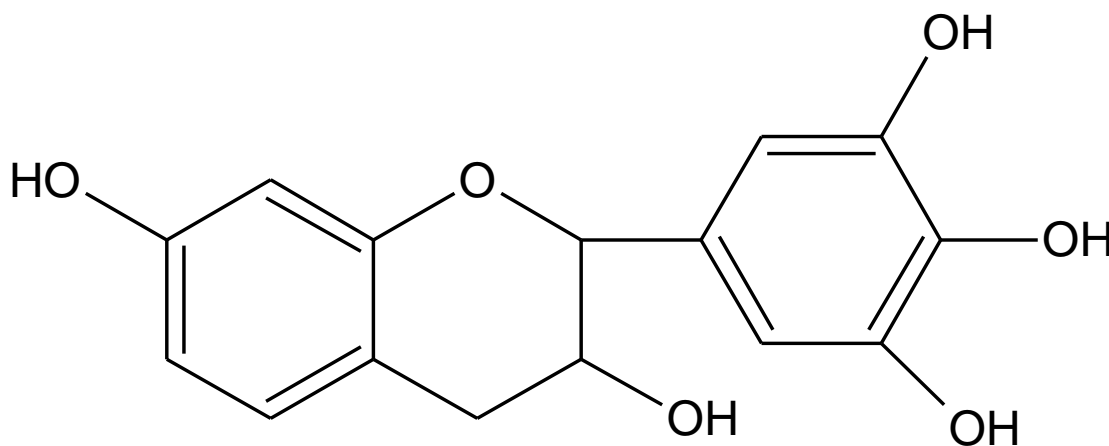


FIGURA 27. ESTRUTURA DA DIHIDROBINETINA IDENTIFICADA NA AMOSTRA m35, DENOMINADA **m2**.  
FONTE: A AUTORA (2014)



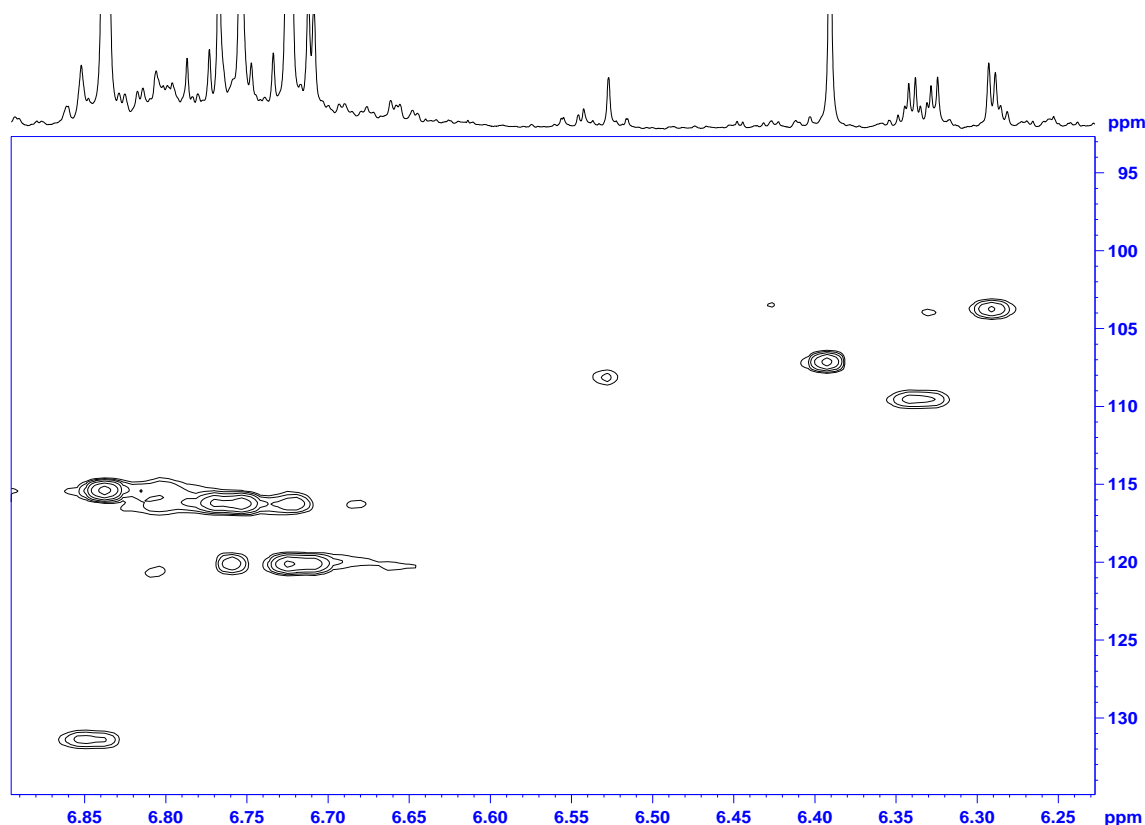


FIGURA 28. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO OS DUBLETOS EM 6,29 ppm E EM 6,84ppm, ALÉM DO DUPLO DUBLETO EM 6,33ppm, E AS RESPECTIVAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).

Do mesmo modo, a figura 29 mostra as correlação direta do hidrogênio em 6,39 ppm ( $J$  0,5), com sua correlação direta com o carbono em 107,1ppm. A análise do experimento de HMBC, que indica as correlações H-C a longa distância, indicou que este hidrogênio está correlacionado com o mesmo carbono em 107,1ppm, ou seja, existe neste anel aromático dois hidrogênios iguais. A pequena constante de acoplamento ( $J$  0,5) indica a presença de outro hidrogênio acoplado com este a quatro ligações.

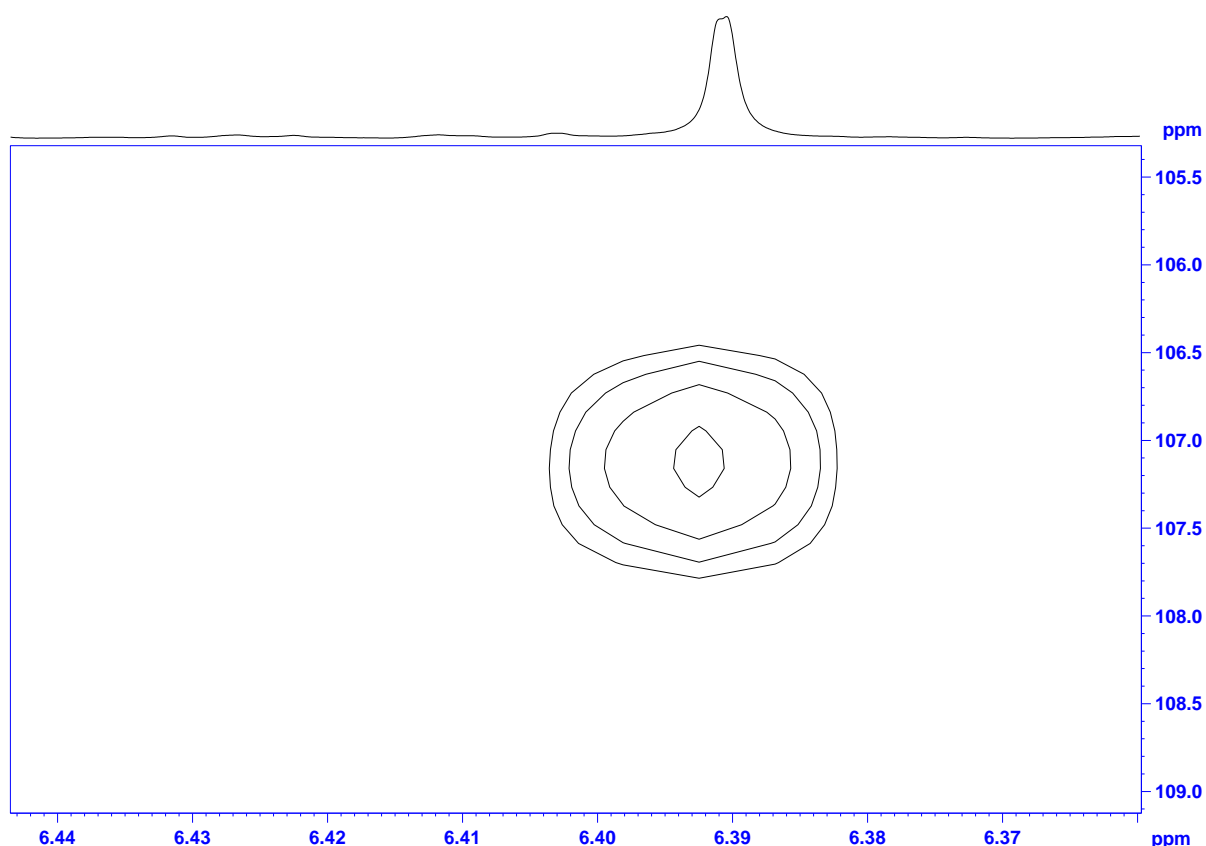


FIGURA 29. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO O DUBLETO EM 6,39 ppm E SUA CORRELAÇÃO DIRETA (600MHz, MeOD).

O duplo dubleto em 4,61 ppm possui correlação direta no HSQC com o carbono em 83,1 ppm e está acoplando com constante de  $J$  6,8 com o duplo duplo dubleto em 4,00 ppm, e de 0,5 com o dubleto em 6,39 ppm. O hidrogênio em 4,00 ppm está ligado diretamente ao carbono em 68,8 ppm. Os dois hidrogênios ligados ao carbono vizinho são o duplo dubleto em 2,66 ppm e o, também duplo dubleto, em 2,86 ppm, estão ligados ao mesmo carbono em 32,7ppm, conforme mostra a figura 30. Esta figura confirma a sobreposição dos sinais do hidrogênio em 2,85 ppm da catequina e em 2,86 ppm do dihidrobinetina, uma vez que se pode observar e comparar as correlações diretas da substância em maior quantidade com as da substância em menor quantidade, diferença esta observada pela intensidade dos sinais.

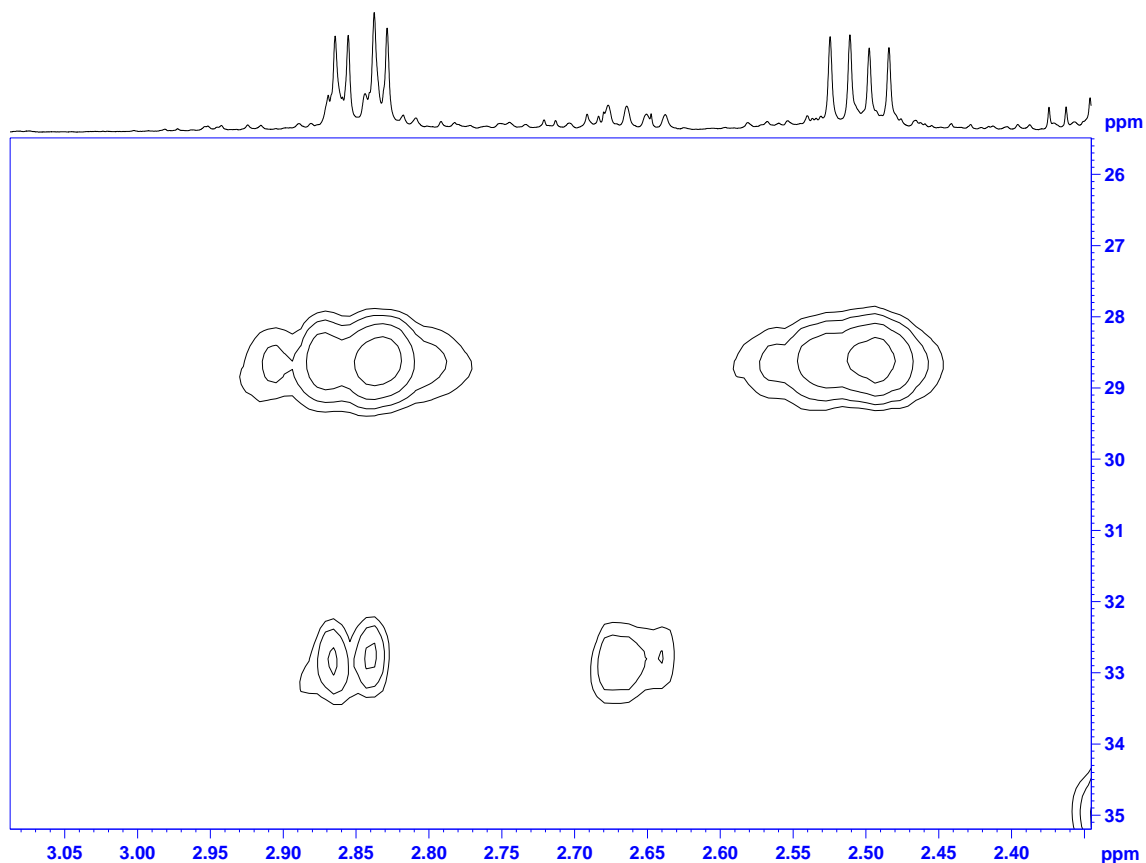


FIGURA 30. APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA M35- M2, MOSTRANDO OS DUPLO DUBLETOS EM 2,66 ppm e EM 2,86 ppm E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS (600MHz, MeOD).

Através da análise do espectro de HMBC da amostra m035 pôde-se chegar aos valores dos demais carbonos pertencentes à estrutura da dihidrobinetina. Tais valores não foram comparados com a literatura, pois não foi encontrada uma descrição dos valores de rmn para esta substância (tabela 13).

TABELA 13. DEMONSTRATIVO DOS VALORES DE HIDROGÊNIO E CARBONO OBTIDOS PARA A SUBSTÂNCIA DIHIDROBINETINA (600MHz, MeOD).

Carbono	Dihidrobinetina (Amostra m35)	
	<sup>1</sup> H (PPM)	<sup>13</sup> C (ppm)
1		
2	4,61 dd ( <i>J</i> 6,8 : 0,5)	83,1
3	4,00 ddd	68,8
4	2,66 dd	
	2,86 dd	32,7
5	6,84 d ( <i>J</i> 8,2)	131,4
6	6,33 dd ( <i>J</i> 8,2 : 2,5)	109,7
7		158,1
8	6,29 d ( <i>J</i> 2,5)	103,6
9		156,2
10		112,6
1'		131,63
2'	6,39 d ( <i>J</i> 0,5)	107,1
3'		147,0
4'		134,0
5'		147,0
6'	6,39 d ( <i>J</i> 0,5)	107,1

FONTE: A AUTORA (2014).

## 5.9 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 5.9.1 INTERFERÊNCIA DE *Microlobius foetidus* SOBRE *Brachiaria decumbens*

O estudo da interferência de *M. foetidus* sobre *B. decumbens* partiu das observações do padrão de dominância de *M. foetidus*, onde outras espécies herbáceas como *B. decumbens*, não conseguem se desenvolver nas proximidades, indicando a interferência no estabelecimento de plantas competidoras. Esse aspecto de dominância pode estar relacionado à liberação de substâncias no ambiente, tornando importantes estudos na fisionomia de *B. decumbens* na área onde estas duas espécies se desenvolvem. Macias e Colaboradores (2007) citam que

adaptações morfológicas e bioquímicas de algumas espécies podem ter surgido através da evolução onde a sobrevivência da espécie é garantida pela liberação de substâncias químicas no ambiente, sendo a liberação uma importante estratégia.

A análise dos dados coletados demonstram que a proximidade da espécie *M. foetidus* afeta o desenvolvimento de *B. decumbens*. Os atributos solo descoberto (18,2%) e matéria morta (60,8%) foram elevados nas parcelas onde *B. decumbens* se desenvolve próxima à *M. foetidus* (0 metros). Tal influencia também foi observada para os indivíduos das distâncias de 5 e 10 metros, sendo que a intensidade destes parâmetros vai diminuindo a medida em que a distância aumenta (tabela 14).

O número de indivíduos para as distâncias estudadas também foram influenciados. Quanto mais próximo às espécies de *M. foetidus*, menor o número de indivíduos de *B. decumbens* amostrados. Estes dados são reforçados quando comparamos os IVI e CR das 5 distâncias estudadas (tabela 14). Na distância inicial (0 metros) o IVI (15,02) e CR( 3,08) são mais baixos do que nas parcelas de 5 metros (IVI- 31,49; CR- 14,46), sendo observado o aumento destes valores de riqueza para as parcelas de 10 (IVI- 45,11; CR- 25,23), 15 (IVI- 53,04; CR- 27,38), e 20 metros 10 (IVI- 55,35; CR- 29,85) (tabela 14).

Nas parcelas com distâncias de 15 e 20 metros, o nº total de espécies, matéria morta, solo descoberto, IVI e CR foram similares, demonstrando que em aproximadamente 15 a 20 metros de distância de *M. foetidus*, não ocorrem alterações no número de indivíduos de *B. decumbens*.

TABELA 14. PARÂMETROS FITOSSOCIOLOGICOS DE *B. decumbens* EM UMA ÁREA DE CERRADO PRÓXIMA À POPULAÇÃO DE *M. foetidus*.

Distância de <i>M. foetidus</i> (metros)	MM* (%)	SD* (%)	Nº total de indivíduos	CA*	FA*	CR*	FR*	IVI*
0	60,8	18,2	155	10,00	0,17	3,08	11,94	15,02
5	43,5	15,7	221	47,00	0,21	14,46	17,03	31,49
10	32,2	12,4	258	82,00	0,33	25,23	19,88	45,11
15	15,4	10,7	331	89,00	0,73	27,38	25,50	53,04
20	10,1	8,1	333	97,00	1,00	29,85	25,65	55,35

\*NOTA: MM: MATÉRIA MORTA, SD: SOLO DESCOBERTO, CA: COBERTURA ABSOLUTA, FA: FREQUÊNCIA ABSOLUTA, CR: COBERTURA RELATIVA, FR: FREQUÊNCIA RELATIVA, IVI: ÍNDICE DE VALOR DE IMPORTÂNCIA.

Pastagens cultivadas foram se expandindo rapidamente nos planaltos do Cerrado Pantaneiro. A espécie *B. decumbens* é muito utilizada por pecuaristas e cobre o solo de forma agressiva, convertendo a vegetação natural em pastagens cultivadas. Poucas são as informações sobre a espécie *M. foetidus*, porém as nossas observações realizadas em campo têm demonstrado que esta espécie forma populações monoespecíficas bem adensadas, o que estabelece uma forte competição intraespecífica, podendo provocar a eliminação de outras espécies do extrato herbáceo em áreas de campo sujo e campo limpo. Outra importante característica observada e que favorece o estabelecimento desta espécie está no fato de que a cada chuva *M. foetidus* floresce, possibilitando o aumento na dispersão de sementes e o sucesso na adaptação desta espécie.

Os resultados demonstram que a espécie *M. foetidus* interfere no estabelecimento de *B. decumbens*, uma vez que houve menor número de indivíduos em cada parcela até 10 metros de distância desta espécie. Quando observa-se o número de indivíduos, CR e FR nas distâncias de 15 e 20 metros, é verificado que os valores obtidos são similares, demonstrando que *M. foetidus* interfere na adaptação de *B. decumbens*, nos primeiros 10 metros de distância.

Alterações na germinação e crescimento de plantas mediado por substâncias, bem como ensaios de alterações no sistema de defesa antioxidante de plantas daninha já foram reportadas na literatura (PERGO; ISHIIWMOTO, 2011; SILVA *et al.* 2009a). Entretanto, poucos são os estudos conduzidos em campo que demonstrem se a situação é ou não real na natureza. Del Moral e Colaboradores (1978) compararam os efeitos competitivos e químicos de duas espécies de eucalipto, e demonstraram que a inibição no crescimento de outras espécies em campo ocorriam pela liberação de lixiviados das folhas de *Eucalyptus baxteri*.

#### 5.9.2 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE *B. decumbens* PRÓXIMAS À *Microlobius foetidus*

O estudo realizado sobre o estabelecimento de *M. foetidus* demonstrou que esta espécie interfere na adaptação de *B. decumbens* em condições naturais. Quando compara-se as alterações no sistema de defesa antioxidante de *B. decumbens*, é verificado que as espécies coletadas nas parcelas com distâncias de 0,5 e 10 metros tiveram um aumento acentuado na atividade das enzimas investigadas, e que nas parcelas de 15 e 20 metros de distância, há uma diminuição da atividade. Na avaliação da defesa antioxidante de *B. decumbens*, verifica-se que houve diferenças significativas no conteúdo de proteínas totais para cada distância avaliada. Indivíduos mais próximos de *M. foetidus* (0 metros) apresentaram maior teor de proteínas totais ( $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) quando comparados aos demais. Os indivíduos coletados nas distâncias de 5 ( $23,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), 10 ( $17,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), 15 ( $12,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 20 metros ( $12,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), apresentam diminuição na produção de proteínas totais, à medida que os indivíduos de *B. decumbens* se distanciam (figura 31 A).

Na atividade das enzimas CAT, POD, SOD e GSH, ocorreu um efeito similar ao que foi observado nos teores de proteínas totais, e os indivíduos mais próximos de *M. foetidus* possuem maiores teores dessas enzimas antioxidantes, como observado na figura 31 B, C, D, E. A maior porcentagem de estímulo na peroxidação de lipídeos foi observada para os indivíduos mais próximos de *M. foetidus* (0 metros). Nas distâncias de 5 e 10 metros, o estímulo da peroxidação se mantém entre 26% e 25%, sendo observado que os efeitos são menos acentuados para as distâncias de 15 (23,1%) e 20 (22,3%) metros (figura 31 F).

A concentração de carboidratos solúveis também variou em função da distância dos indivíduos de *B. decumbens*. Quanto mais próximos, maior o conteúdo de carboidratos, onde os indivíduos da distância inicial (0 metros) apresentaram teores de  $1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Quando comparamos estes resultados aos dados obtidos para o solo descoberto e quantidade de matéria morta para cada distância, é observado que os indivíduos que crescem nas proximidades de *M. foetidus*, podem sofrer interferência de compostos liberados no ambiente, pela matéria morta, oriundas das folhas desta espécie (figura 31 G).

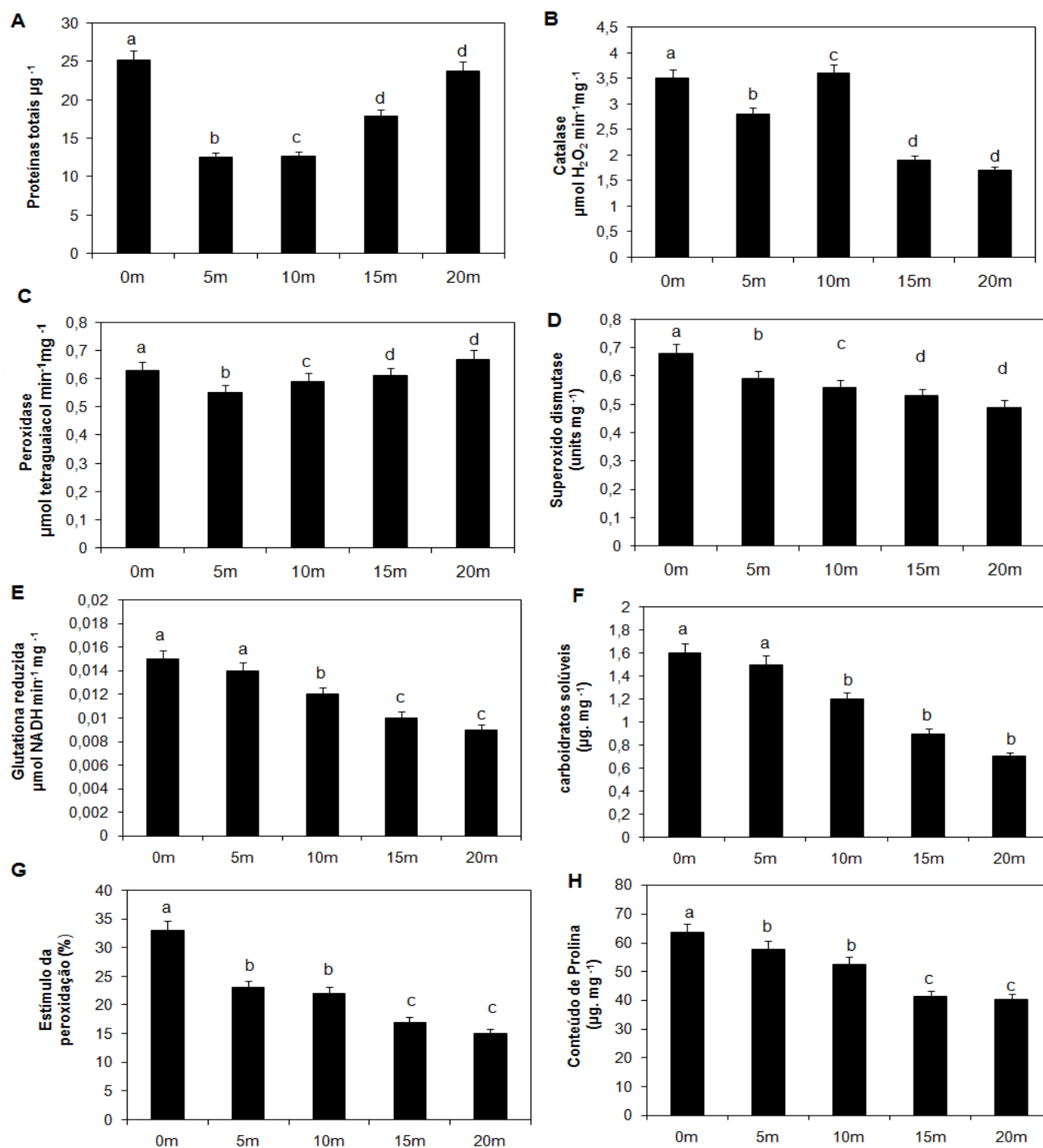


FIGURA 31. TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS (A), E ATIVIDADES DA CATALASE (B), PEROXIDASE (C), SUPERÓXIDO DISMUTASE (D), GLUTATIONA REDUZIDA (E), CARBOIDRATOS SOLÚVEIS (F), PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (G) E CONTEÚDO DE PROLINA (H) DE *B. decumbens*, COLETADAS EM DIFERENTES DISTÂNCIAS DE *M. foetidus*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).



Quando os indivíduos de *B. decumbens* têm alterações no seu sistema de defesa antioxidante, bem como a diminuição no número de perfílios, como indicado pela porcentagem de solo descoberto pode ocorrer o deslocamento de carboidratos solúveis das folhas em senescência para outras partes da planta, aumentando dessa forma o conteúdo de carboidratos nestes indivíduos que se desenvolvem nas proximidades de *M. foetidus*. A concentração de prolina nas folhas de *B. decumbens* variou em função da distância dos indivíduos de *M. foetidus*. Verificou-se que os indivíduos coletados nas parcelas de 0 ( $53,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), 5 ( $52,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 10 ( $52,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) metros possuem maior conteúdo de prolina do que as parcelas nas distâncias de 15 ( $41,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 20 ( $40,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) metros (figura 31 H). O alto teor de prolina nos indivíduos coletados próximos à *M. foetidus* provavelmente ocorreu para atuar na proteção contra a peroxidação lipídica, por ativar ou mesmo atuar diretamente na remoção das espécies reativas de oxigênio.

A comparação entre as atividades das enzimas ensaiadas revelam que a SOD e CAT são provavelmente as principais enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de ROS em *B. decumbens*. A espécie também contém enzimas acessórias que neutralizam  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como peroxidases. As peroxidases podem existir em varias formas isoenzimáticas e implicam numa vasta gama de processos fisiológicos como ligação a polímeros da parede celular por interações iônicas ou covalentes, tendo um papel na biossíntese de lignina na parede celular (PASSARDI *et al.* 2005; QUIROGA *et al.* 2000).

É pouco provável que o ciclo da GSH esteja contribuindo significativamente para a eliminação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em *B. decumbens*. Como catalisa o último passo do ciclo, apresentou baixa atividade quando comparada as demais enzimas antioxidantes. Os papéis fisiológicos dessas enzimas na germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas, não são completamente conhecidos. Foi sugerido que elas desempenham um papel primordial na hidratação de tecidos, alongamento das células e armazenamento de azoto (RODRIGUEZ-CONCEPTION *et al.* 1995), além da degradação de lípidos de reserva (FEUSSNER *et al.* 1997).

Acredita-se que o aumento da peroxidação lipídica como resposta imediata às mudanças na estrutura da membrana celular tenha sido induzido pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (SIEDOW; MOORE 1991; BAKER; ORLANDI 1995; THALER, 1999, PORTA; ROCHA-SOSA, 2002, BLOKHIN *et al.*,

2003). A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados leva à diminuição de fluidez das membranas, aumento de perda do conteúdo celular ou da organela, além de causar danos secundários às proteínas de membranas (HALLIWELL, 2006).

Os indivíduos que se encontravam à uma distância de até 10 metros de *M. foetidus* apresentaram maior teor de carboidratos solúveis do que os indivíduos situados aos 25 e 20 metros de distância. A principal função dos carboidratos nos organismos vegetais é o fornecimento de energia. Esse processo se denomina glicólise, que é a degradação da glicose com liberação de energia e formação dos ácidos láctico e pirúvico. Assim, além de constituir fonte de energia para os processos vitais, a glicose é um carboidrato necessário para a síntese de grande número de compostos químicos fundamentais para o metabolismo da planta (PALMA *et al.*, 2002).

O conteúdo de prolina nos indivíduos coletados também foi influenciado pela proximidade da espécie *M. foetidus*, sendo reportado na literatura que plantas aumentam o conteúdo de prolina para combater a peroxidação lipídica (MOLINARI *et al.*, 2007). Dessa forma, acredita-se que o aumento na produção das enzimas antioxidantes exigiu maior demanda de energia, contribuindo para a diminuição na cobertura vegetal em decorrência da paralisação do crescimento, e com a intensidade do estresse, em função da hidrólise do amido, como tem sido reportado por Pimentel (1999).

As gramíneas estão entre as espécies invasoras com alta capacidade de colonizar florestas, bem como áreas mais densas de Cerrado como ocorre no Pantanal. No caso de *B. decumbens*, a sua capacidade de excluir as espécies nativas tem sido reportada (MATOS; PIVELLO 2009; OLIVEIRA, 2004). Realizar um controle de *B. decumbens* em áreas protegidas tem se tornado um desafio, uma vez que esta espécie se beneficia com as queimadas que são tão comuns durante a estação seca. Substâncias presentes das folhas de *M. foetidus* podem ser investigadas com a finalidade de estabelecer um plano de controle de *B. decumbens* em áreas protegidas. Independentemente dos mecanismos primários do estresse oxidativo induzido por *M. foetidus*, estes dados sugerem que, durante o crescimento, a atividade das enzimas antioxidantes investigadas aumenta e neutralizam as espécies reativas de oxigênio, deixando as plantas em campo mais vulneráveis à disfunção e morte celular

Em agro-ecossistemas, aleloquímicos liberados de plantas e que provocam aumento do estresse oxidativo podem contribuir para a descoberta de substâncias naturais que podem ser utilizados para o controle de espécies invasoras (INDERJIT; DUKE, 2003). De fato, sabe-se que alguns herbicidas comerciais causam a morte celular através da indução do estresse oxidativo. Esta é uma consequência de uma interferência no fluxo de elétrons do fotossistema II (PSII) ou ainda pela inibição da síntese de compostos anti-oxidantes, como os carotenóides (KRUSE *et al.*, 2006). É razoável sugerir que a espécie *M. foetidus* tem um alto potencial de atuar como inibidora na cobertura vegetal de *B. decumbens* através do seu efeito na indução do estresse oxidativo durante o seu desenvolvimento, levando ao aumento no conteúdo das enzimas aqui investigadas.

#### 5.9.3 EFEITO ALELOPÁTICO DOS ÓLOEOS VOLÁTEIS DE *A. extraaxillaris* SOBRE *B. decumbens*

Os resultados de germinação demonstraram que todas as concentrações afetaram o processo germinativo da em *B. decumbens* e que apenas a concentração mais elevada causou a inibição acima de 50% (Figura 32 A). O processo global de germinação consiste em três fases parciais: embebição, ativação e crescimento intraseminal. a dificuldade em estabelecer o início e o final destas fases faz com que a determinação da germinação seja avaliada por um critério macroscópico: a protrusão da raiz primária (RANAL; SANTANA, 2006). Esse processo é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento da plântula, mas a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto, com a germinação ou não da semente (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Além dos testes de germinação, os testes biométricos (medição da raiz e hipocótilo) são importantes na determinação de mudanças nas plântulas causadas pelas substâncias-teste (PIÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Assim como observado na germinação, a intensidade dos efeitos sobre o desenvolvimento da raiz de *B. decumbens* ocorreram em todas concentrações, existindo uma relação de dose

dependência nas concentrações, sendo observadas reduções de  $\pm 58\%$  e  $\pm 52\%$  para as concentrações de 5,0% e 2,5%, respectivamente (Figura 32 B). Em relação ao crescimento do mesocótilo, inibições de  $\pm 63\%$  foram verificados na maior concentração testada.

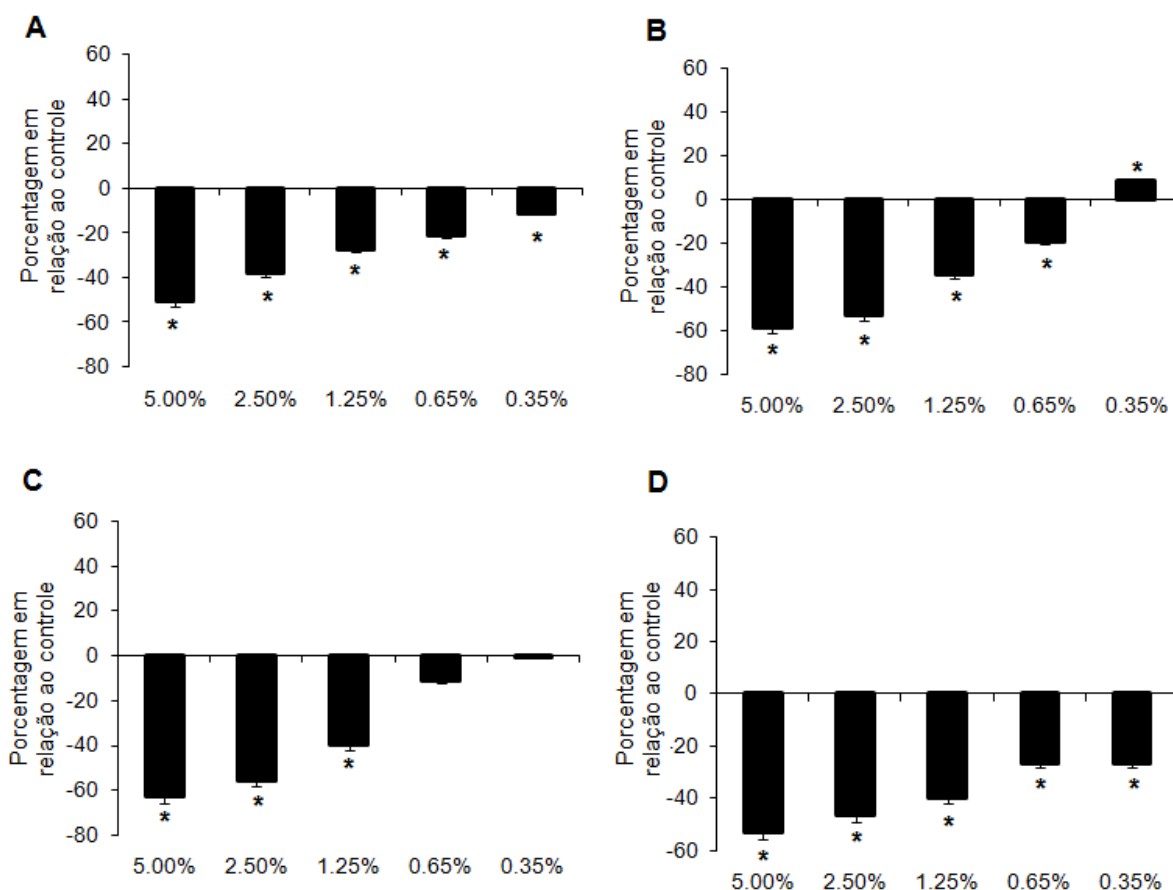


FIGURA 32. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Asemeia extraaxillaris* NA GERMINABILIDADE (A), CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (B), MESOCOTILO (C) E MASSA SECA (D). \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

As concentrações de 0,12% e 0,05% não foram suficientes para reduzir o crescimento do mesocótilo (Figura 32 C). A avaliação tem fundamental importância em alelopatia, pois a redução acentuada da raiz pode afetar a capacidade

competitiva e a produtividade da planta, e a redução da parte aérea (hipocótilo) pode diminuir a capacidade da planta em competir por luz (NINKOVIC, 2003).

Com relação à massa seca, foi verificado que as concentrações dos óleos também causaram redução na massa final das plântulas, o que corrobora com os dados coletados, justificando a inibição da raiz primária e mesocótilo em  $\pm 53\%$  para a concentração de 5,0% (Figuras 32 D). De acordo com os resultados pode – se inferir que o óleo influencia tanto na germinação quanto no crescimento de *B. decumbens*, existindo uma relação dose- dependente.

As mudanças nos padrões de germinação pode resultar em vários efeitos à nível primário (GUSMAN *et al.*, 2008). Entre eles, são conhecidos alterações na permeabilidade da membrana, transcrição e tradução do DNA, atividade respiratória, a expressão de enzimas e receptores, ou mesmo a combinação de todos estes aspectos (FERREIRA; AQUILA, 2000).

A presença da espécie *A. extraaxillaris* em uma área de pastagem sem ser afetada pela competição com gramíneas africanas cultivadas pode ser associada com a presença dos óleos voláteis nas raízes. Mesmo em pequenas quantidades, estes óleos podem estar atuando no estabelecimento de *A. extraaxillaris*, evitando sua extinção nesses locais.

Alguns estudos mostram que a intensa produtividade das gramíneas geram grandes quantidades de biomassa e na época da seca o volume de biomassa vegetal morta facilita a ocorrência de grandes incêndios (HUGHES *et al.*, 1991; ASNER; BEATTY, 1996; D'ANTONIO; VITOUSEK, 2002). Pott e Pott (1994) relataram que as raízes de algumas espécies do gênero *Asemeia* sobrevivem ao fogo, ocorrendo o rebrotamento após a chuva.

#### 5.9.4 EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. extraaxillaris* SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO DE *B. decumbens*

Os resultados obtidos demonstram que os óleos voláteis de *A. extraaxillaris* aumenta o estresse oxidativo em *B. decumbens*, sendo tal fato verificado pelo

aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Todas as concentrações aumentaram a atividade da GLU e PAL em *B. decumbens*. A maior produção de GLU ( $\pm 26,57 \mu\text{mol}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) e PAL ( $\pm 17,5 \mu\text{mol}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) ocorreram para a concentração de 5,0% (Figura 33 A e B). Os níveis de CAT e POD também aumentaram em  $\pm 7,75 \mu\text{mol}.\text{H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  e  $\pm 15,5 \mu\text{mol}.\text{tetraguaiacol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  respectivamente, na concentração de 5,0%, sendo que estes efeitos foram semelhantes às atividades de GLU e PAL. Somente as maiores concentrações promoveram um aumento na atividade de POD e CAT, e as menores concentrações não foram suficiente para promover o estresse oxidativo (Figura 33 C e D).

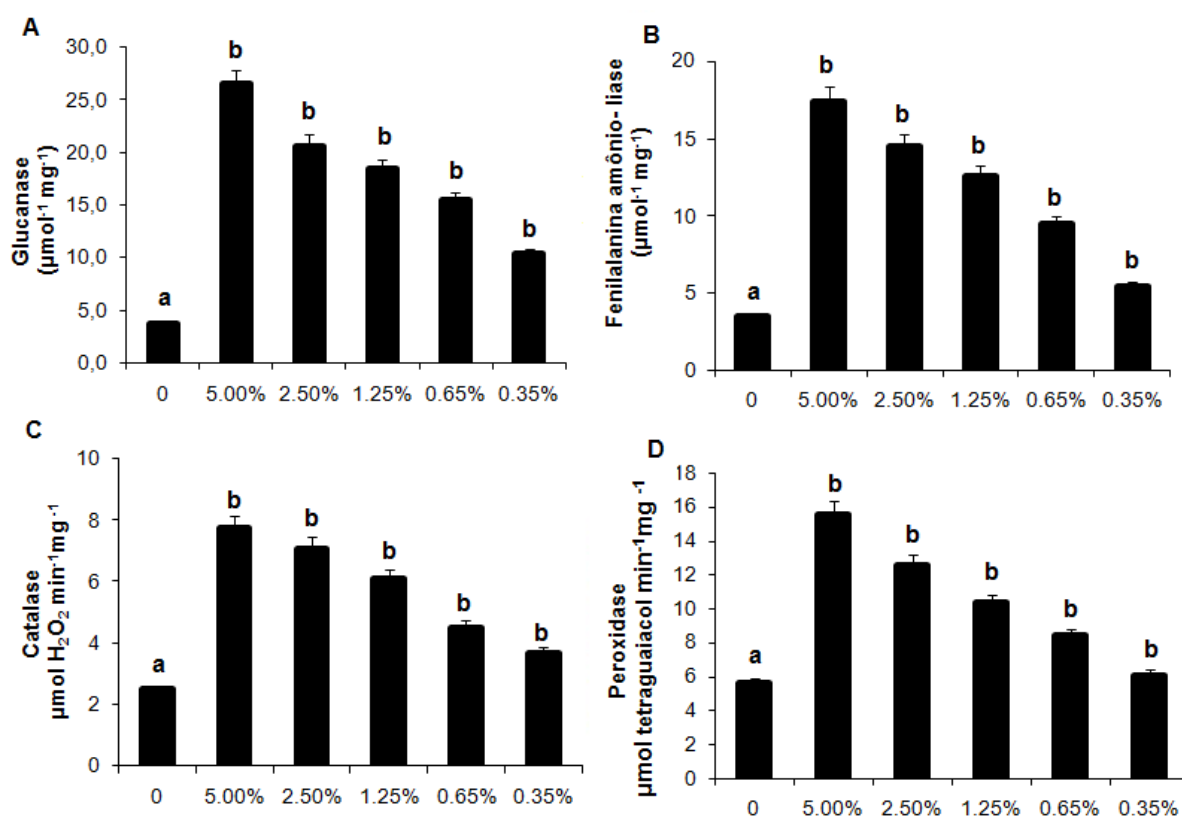


FIGURA 33. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. EXTRAAXILLARIS* NA ATIVIDADE DA GLUCANASE (A) FENILALANINA AMÔNIO- LIASE (B), CATALASE (C) E PEROXIDASE (D). MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

O óleo nas concentrações testadas aumentou a peroxidação lipídica e SOD em todas as concentrações ensaiadas. Esse efeito foi mais severo na concentração de 5,0%, com aumento de  $\pm 55\%$  e  $\pm 76,8 \text{ U.mg}^{-1}$  para a peroxidação e SOD (Figura 34 A e B). O aumento no teor de proteínas totais também foi observado ( $\pm 17,52 \mu\text{g}^{-1}$  na concentração de 5,0%) (Figura 34 C).

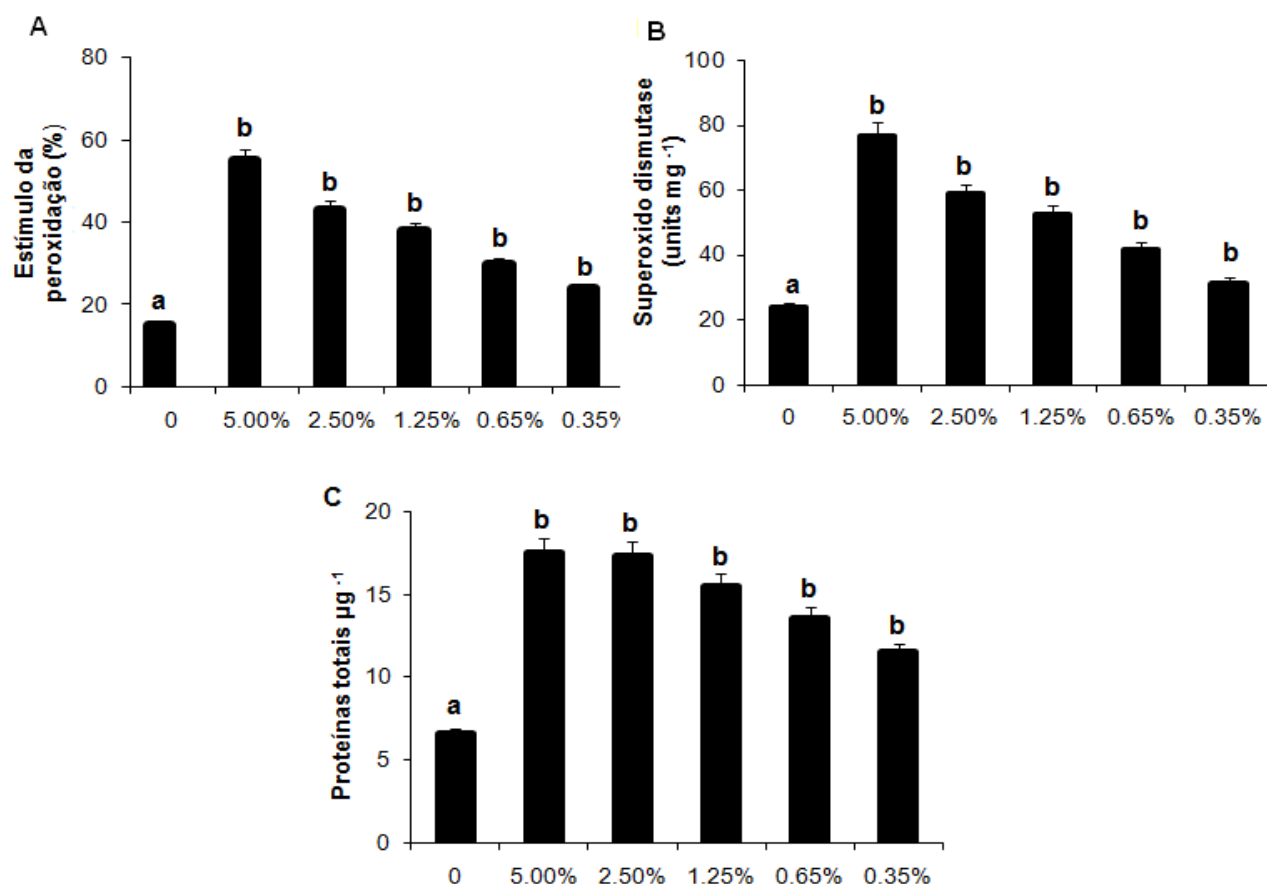


FIGURA 34. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. extraaxillaris* NO ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (A) SUPERÓXIDO DISMUTASE (B) E PROTEÍNAS TOTAIS EM PLÂNTULAS DE *B. decumbens*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

O aumento da atividade enzimática da catalase, peroxidase e superóxido dismutase está relacionado com o stress oxidativo causado pelos óleos voláteis,

uma vez que estas são as principais enzimas envolvidas na eliminação das EROS durante o processo de germinação, e que também estão associados com uma ampla variedade de processos fisiológicos, dentre eles, a proteção contra patógenos, injúrias ou competição com outras espécies (PASSARDI *et al.*, 2005; ALMAGRO *et al.*, 2009).

As alterações nos níveis de  $\beta$ -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase, indicam um aumento na defesa antioxidante da planta contra as formas reativas de oxigênio (MOROHASHI; MATSUSHIMA, 2000). O aumento da produção de glucanase e fenilalanina está provavelmente relacionado com necrose apical e inibição do crescimento em *B. decumbens*, como observado na figura 30. Estudos mostraram que a fenilalanina amônio liase catalisa a primeira de uma série de reações metabólicas produzindo muitos produtos naturais à base de fenilpropanoides (GAYOSO *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2005), que são importantes no crescimento das plantas e também atuam na proteção contra agressões ambientais (DIXON; PAIVA, 1995; CHENG *et al.*, 2001). Catalase, peroxidase e superóxido dismutase contribuem para as respostas das plantas ao estresse, pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio na retomada dos processos mitocondriais durante a embebição das sementes (BLOKHIN *et al.*, 2003; PORTA; ROCHA-SOSA, 2006).

O aumento das concentrações dos óleos voláteis de *A. extraaxillaris* causou reduções acentuadas do índice mitótico (Tabela 15), o maior efeito depressivo foi verificado para a concentração de 5,0%, com valores de  $\pm 45\%$ . Comparando as frequências das diferentes fases da mitose, para cada tratamento, foi verificado diminuição da frequência de prófase e demais outras fases em relação ao controle, onde uma redução na divisão celular pode ser observada a partir da concentração de 0,65%.



TABELA 15. ÍNDICE MITÓTICO, DIFERENTES FASES DA DIVISÃO CELULAR E ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DAS RAÍZES DE *B. decumbens*, EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS DE *A. extraaxillaris*.

n=3	Controle	5,00%	2,50%	1,25%	0,65%	0,35%
<b>Índice mitótico<sup>1</sup></b>	87,44±1,38	45,78±0,19*	47,00±0,33*	59,67±0,33*	64,78±1,67*	70,67±0,67*
<b>Profase<sup>1</sup></b>	165,00±1,05	72,00±1,00*	98,33±0,57*	115,33±1,76*	134,00±2,08*	166,33±1,20 <sup>n</sup>
<b>Metafase<sup>1</sup></b>	62,67±2,08	42,67±1,52*	55,67±2,08 <sup>ns</sup>	61,67±2,05 <sup>ns</sup>	62,33±2,30 <sup>ns</sup>	62,00±1,46 <sup>ns</sup>
<b>Anafase<sup>1</sup></b>	37,00±1,46	12,00±0,00*	14,33±1,15*	20,66±1,15*	25,33±2,03*	30,66±1,05*
<b>Telofase<sup>1</sup></b>	30,66±1,50	10,66±1,15*	12,66±2,03*	19,33±1,15*	20,66±1,55*	28,66±1,55 <sup>ns</sup>
<b>Interfase<sup>1</sup></b>	21,00±1,00	9,66±1,52 <sup>ns</sup>	15,33±2,51 <sup>ns</sup>	15,00±0,00 <sup>ns</sup>	16,33±1,52 <sup>ns</sup>	16,66±1,85 <sup>ns</sup>

n=3	Atividade citotóxica					
Tipo de alteração	Controle	5,00%	2,50%	1,25%	0,65%	0,35%
<b>CPN<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	0,61±0,41*	0,21±0,46*	0,12±0,28*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>NB<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	0,35±0,29*	0,26±0,72*	0,18±0,04*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>CND<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	1,56±0,75*	1,22±0,29*	0,88±0,34*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>CP<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	1,28±0,23*	2,33±0,08*	1,12±0,07*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>APC<sup>1</sup></b>	1,33±1,52	2,89±0,33*	1,29±0,37 <sup>ns</sup>	0,78±0,05 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>TPC<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	2,76±0,13*	1,56±1,23*	0,99±0,04*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>NA<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	3,33±0,04*	1,42±0,22*	0,67±0,01*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>NAI<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	3,52±0,01*	2,32±0,14*	0,78±0,12*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>PCM<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	2,23±1,34*	1,98±0,71*	0,87±0,18*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>AM<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	4,44±0,21*	2,35±0,09*	1,27±0,17*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>CAPN<sup>1</sup></b>	0,00±0,00	1,23±0,35*	0,89±0,42*	0,37±0,05*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>
<b>AC<sup>1</sup></b>	1,33±0,40	8,03±0,36*	15,83±0,77*	8,03±0,37*	0,00±0,00 <sup>ns</sup>	0,00±0,00 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup>\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $p < 0.05$ ).<sup>ns</sup> NÃO SIGNIFICATIVO. **PCN**: CÉLULA POLINUCLEADA; **BN**: BROTO NUCLEARE; **CND**: CÉLULA COM NÚCLEO DISFORME; **CP**: CÉLULA POLIPLÓIDE; **APC**: ANÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA; **TPC**: TELÓFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA; **NA**: NÚCLEO AMEBÓIDE; **NAI**: NÚCLEO AMEBÓIDE EM INTÉRFASE; **PCM**: PERDA DE CROMOSSOMOS EM METÁFASE; **AM**: ANÁFASE MULTIPOLAR; **CAPN**: CÉLULA AMEBÓIDE POLINUCLEADA; **AC**: ABERRAÇÕES CELULARES.

A interferência de crescimento de *B. decumbens* na presença de óleos voláteis está associada com as interferências no processo de divisão celular, por meio de diminuição parcial das fases subsequentes de divisão, causada pelo aumento nas concentrações dos óleos voláteis e que podem ser associadas com alterações na estrutura de cromossomos na prófase e metáfase, bem como distúrbios na prófase e anáfase. Mudanças similares foram observadas em

cromátides de *A. cepa* submetidas ao extrato aquoso de *Taxus baccata* (MAJEWSKA *et al.*, 2000).

Apenas as concentrações 5,0%, 2,5% e 1,25% provocaram alterações citotóxicas. Dentre estas alterações, foram observados o surgimento de células polinucleares, brotos nucleares, células com núcleo disforme, células poliplóides, anafase com perda cromossômica entre outros (Tabela 15). As outras concentrações não provocaram os mesmos efeitos. O óleo volátil causa interferência na divisão celular, e o seu efeito é mais acentuado na morfologia do sistema radicular o que provavelmente representa um dos mecanismos de ação dos óleos no desenvolvimento da planta de teste (figura 35).

Alterações citotóxicas, tais como a presença de células com núcleo poliplóide, foram também observados. Essas alterações podem ter ocorrido como uma consequência da dificuldade na formação do fragmoplasto durante a citocinese. Os resultados obtidos sugerem que o aumento no número de aberrações cromossômicas pode ter ocorrido como resultado da despolicimerização e inativação dos fusos mitóticos durante o processo de divisão, o que pode promover aderências cromossômicas (FERNANDES *et al.*, 2007). A aderência cromossômica é um sinal comum na atividade tóxica sobre o material genético e podem ter provavelmente consequências irreversíveis para a célula (FISKEJO, 1985; MARCANO *et al.*, 1998).

A substância 1-2 (hidroxyphenyl)-etanona é o principal constituinte dos óleos voláteis das raízes de *A. extraaxillares*. As concentrações mais elevadas desses óleos voláteis são responsáveis pelo estresse oxidativo em *B. decumbens*, causando interferência na germinação e crescimento das espécies estudadas, bem como as mudanças no processo de divisão celular e da atividade citotóxica. Em relação a este último efeito, a desorganização nos microtúbulos do fuso mitótico é principalmente devido à falta de uma boa separação dos cromossomos, tal como observado no estudo, durante a divisão celular, que pode ser a principal causa da inibição do crescimento. Da mesma forma, o bloqueio da citocinese pode ser a principal causa da formação de células poliplóides.

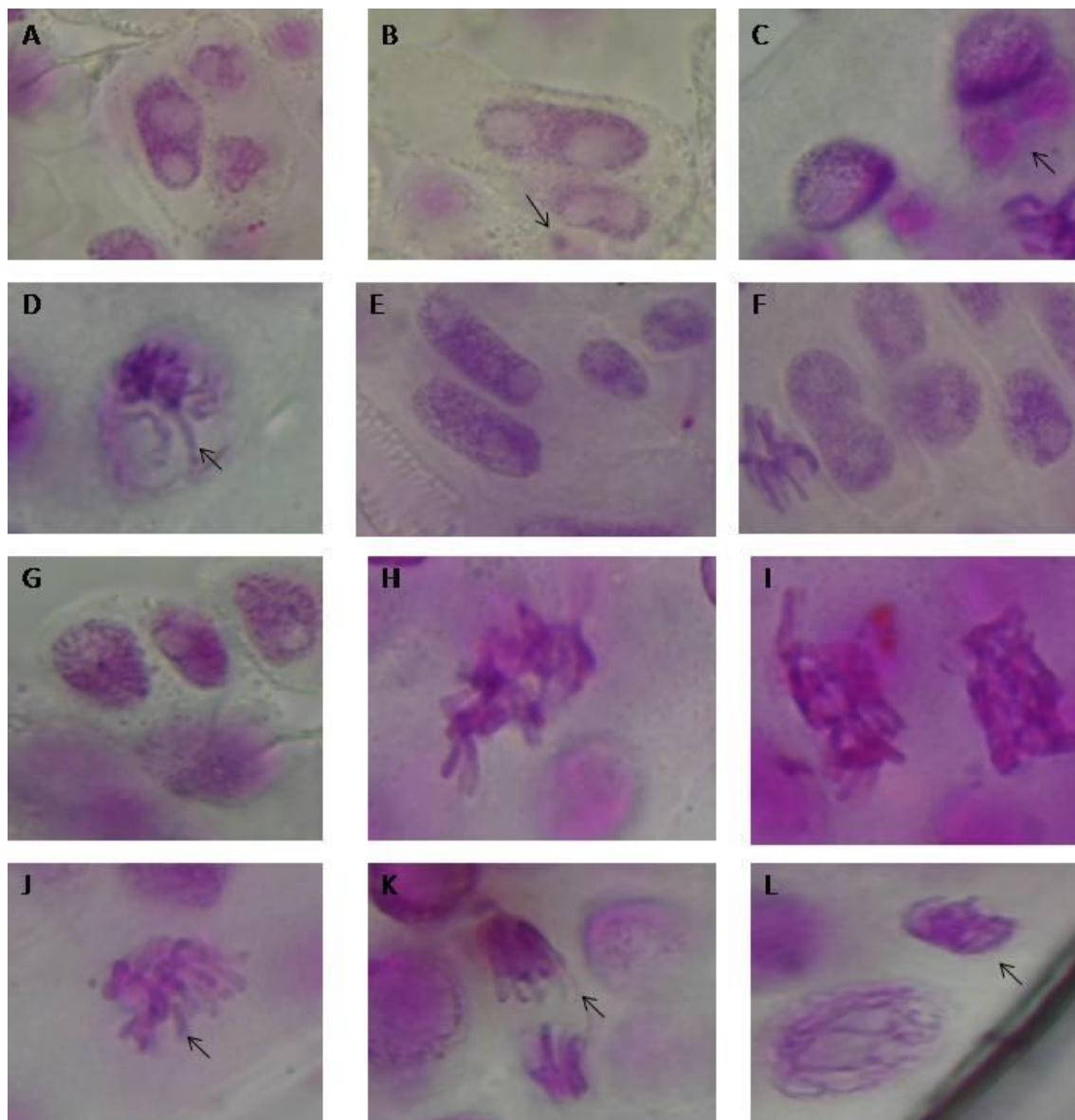


FIGURA 35. ALTERAÇÕES MUTAGÊNICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *B. decumbens*, SUBMETIDAS AOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *A. extraaxillaris*. **A:** CÉLULA POLINUCLEADA, **B:** CÉLULA POLINUCLEADA COM MICRONÚCLEO, **C:** CÉLULA COM BROTO NUCLEAR, **D:** ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, **E E F:** CÉLULA COM NÚCLEO AMEBÓIDE, **G:** CÉLULA AMEBÓIDE, **H:** ANÁFASE MULTIPOLAR, **I:** CÉLULA POLIPLÍDE COM PERDA CROMOSSÔMICA, **J:** METÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA, **K:** TELÓFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, **L:** CÉLULA EM METÁFASE E MICRONÚCLEO EM PRÓFASE.

Os efeitos observados para a atividade mitótica também pode contribuir para a compreensão dos efeitos dos óleos voláteis sobre o crescimento de *B.*

*decumbens*. Estudos destinados a determinar a atividade sinérgica exercida por substâncias presentes nos óleos voláteis também podem contribuir para a compreensão das relações ecológicas entre as duas espécies.

Alterações no sistema de defesa antioxidante de *B. decumbens* foram observados, indicando que os óleos provocam aumento do estresse oxidativo. Estes resultados confirmam as investigações sobre a inibição da formação de ATP, a captura de prótons e na taxa de transporte de elétrons pela atividade de p-hidroxiacetofenona (CÉSPEDES *et al.*, 2002), onde presença de funções oxigenadas (hidroxila) aumenta significativamente o potencial inibitório desta substância. Consequentemente, esses radicais podem afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares, causando danos ao DNA e proteínas, levando a alterações na germinação e crescimento. As enzimas investigadas produzidas excessivamente por *B. decumbens* podem ter os níveis aumentados com a finalidade de proteger as células dos efeitos tóxicos destes radicais.

#### 5.9.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* EM LABORATÓRIO

Os bioensaios realizados com os óleos voláteis de *M. foetidus*, mostraram que este afetou de maneira acentuada a germinação e o crescimento de *I. cordifolia* e *B. decumbens*. Em *I. cordifolia*, a maior concentração causou diminuição superior a 50%. Entre as duas espécies avaliadas como bioindicadoras, verificamos que os óleos voláteis afetaram mais a germinação de *I. cordifolia* do que *B. decumbens*, onde a maior concentração causou inibição na germinação de  $\pm 61\%$  e  $\pm 52\%$  (concentrações de 5,0% e 2,5%) (Figura 36 A,B). Os mesmos efeitos foram observados em casa de vegetação para a espécie *I. cordifolia*, onde todas as concentrações afetaram a emergência final das plântulas. Estes mesmos efeitos não foram observados para *B. decumbens*, pois somente as concentrações de 2,5 e 5,0% foram capazes de afetar a emergência de plântulas nesta espécie (figura 37 A,B).

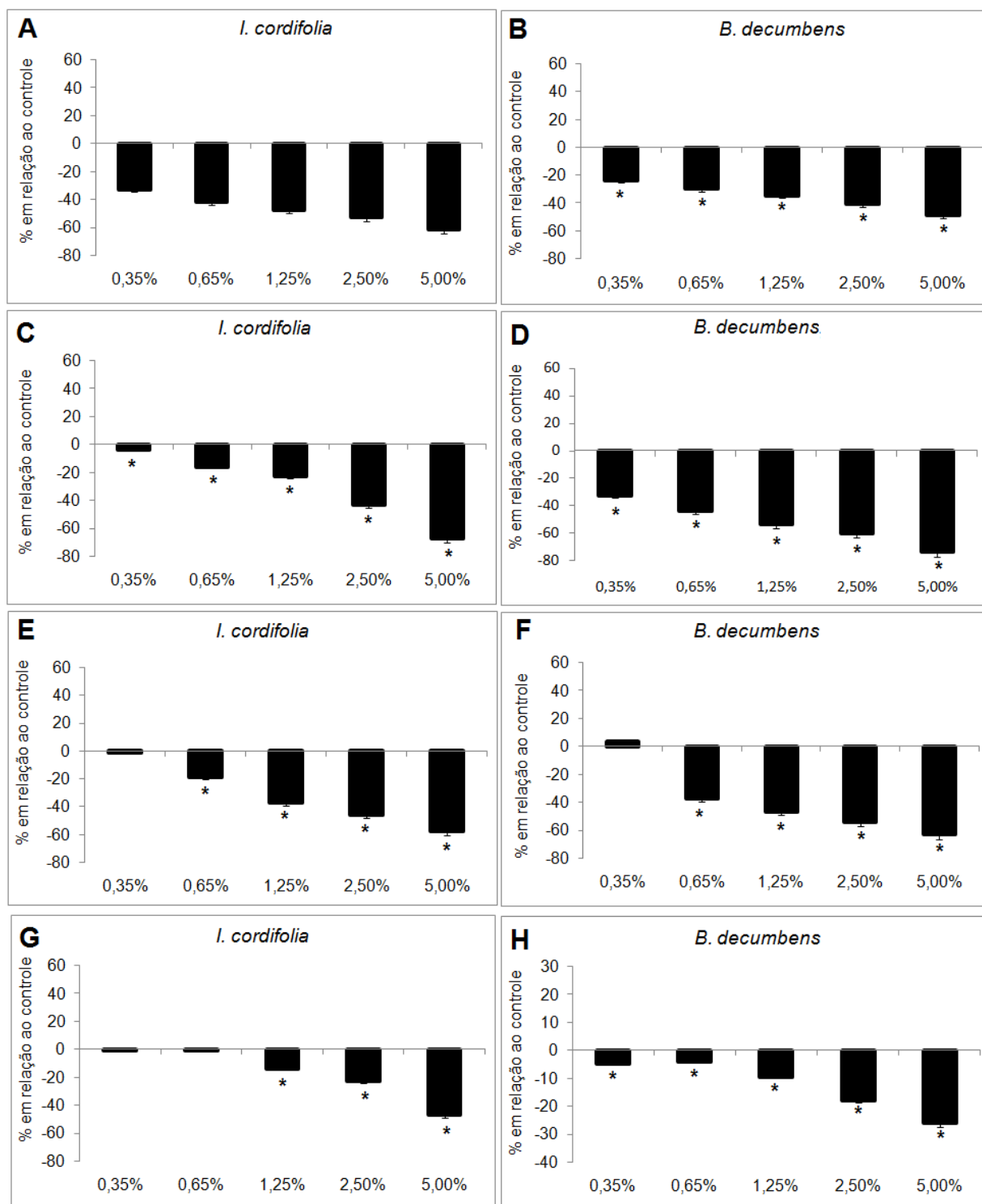


FIGURA 36. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS OLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA GERMINABILIDADE (A,B), CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (C,D), HIPOCÓTILO/MESOCÓTILO (E,F) E MASSA SECA (G,H) DE *I. cordifolia* E *B. decumbens*. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

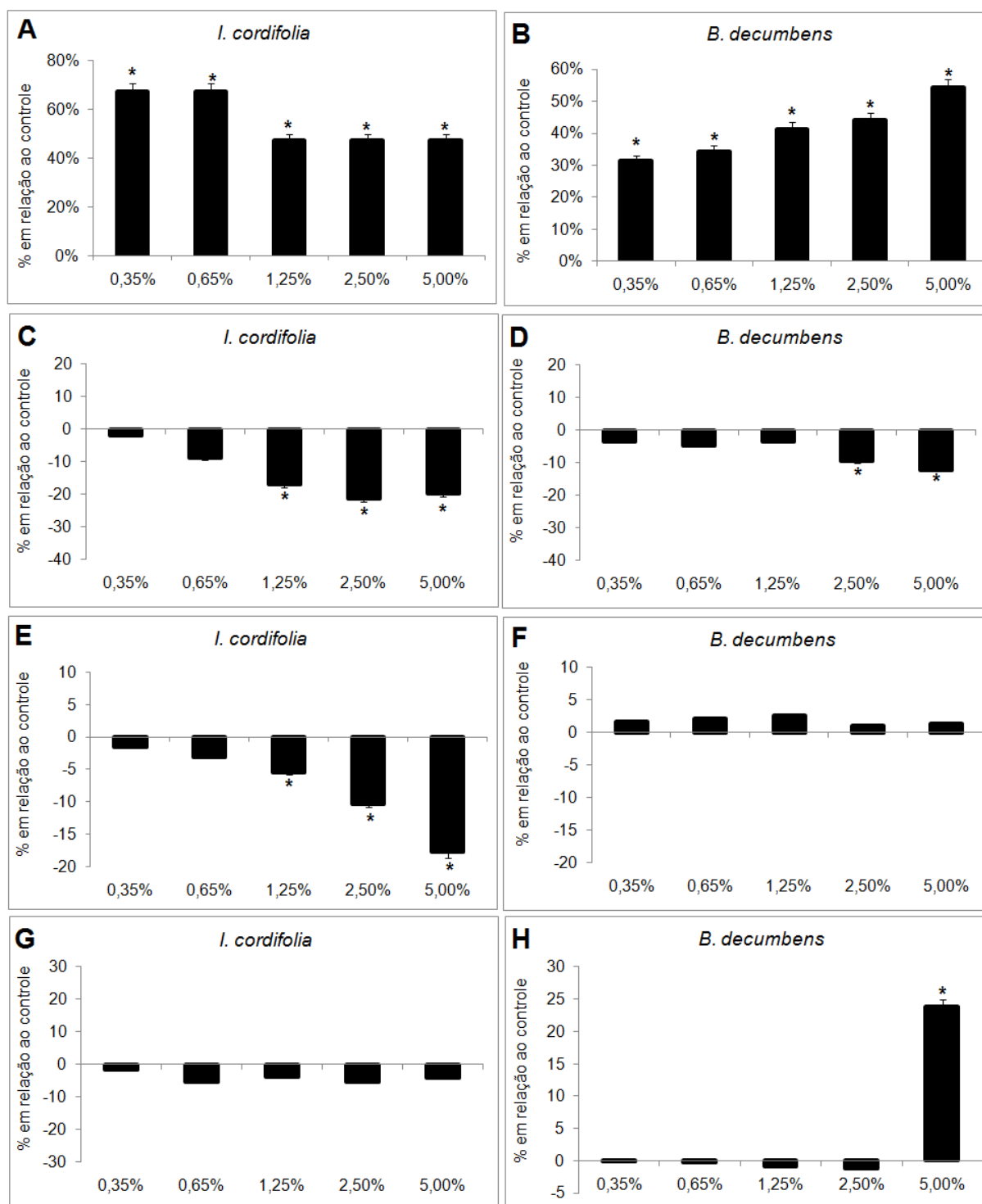


FIGURA 37. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA EMERGÊNCIA (A,B), CRESCIMENTO DA RAIZ (C,D), PARTE AÉREA (E,F) E MASSA SECA (G,H) DE *I. cordifolia* e *B. decumbens* EM CASA DE VEGETAÇÃO. MEDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Quando avaliamos as alterações no crescimento, foi verificado que a raiz e mesocótilo de *B. decumbens* foram os mais afetados. A raiz primária de *I. cordifolia* sofreu redução de  $\pm 67\%$ , e *B. decumbens*  $\pm 73\%$  para a concentração de 5,0%, e a concentração de 0,5% e 0,25% ainda causaram inibições superiores a 50% ( $\pm 60\%$  e  $\pm 53\%$  respectivamente) em *B. decumbens* (Figura 36 C,D). Efeitos similares foram verificados no crescimento do hipocótilo/coleótilo, entretanto, tanto *I. cordifolia* quanto *B. decumbens*, sofreram reduções superiores a 50% na concentração de 5,0% ( $\pm 57\%$  e  $\pm 63\%$  respectivamente), sendo este efeito ainda observado para a concentração de 0,5% em *B. decumbens* ( $\pm 54\%$ ) (Figura 36 E,F).

Nos dados obtidos em casa de vegetação, foi verificado que os óleos afetaram as raízes de *I. cordifolia* com maior intensidade do que *B. decumbens*. Entretanto os efeitos observados não chegaram a 30% de inibição (28,57% em *I. cordifolia* e 7,69% em *B. decumbens*) demonstrando que o efeito inibitório é mais intenso no início do desenvolvimento das plântulas (figura 37 C,D). Os resultados encontrados na redução da parte aérea/subterrânea estão de acordo com o peso seco final, para as plântulas investigadas em condições de laboratório, onde a perda de massa foi gradativamente diminuída em função do aumento das concentrações. No entanto, *I. cordifolia* apresentou maior redução na produção final de massa, quando comparada a *B. decumbens* (figura 36 G,H).

Nos resultados obtidos em casa de vegetação, foi observado que a raiz foi mais afetada do que a parte aérea, sendo que em *B. decumbens*, os óleos voláteis não afetaram a produção de biomassa da parte aérea e apenas a concentração de 5,0% causou perda de biomassa em 23,83%, sendo os efeitos na perda de biomassa pelas raízes superiores aos efeitos observados para *I. cordifolia* (4,13%), com 17,74% de redução da parte aérea (figura 37 G,H). Estes resultados mostram que as raízes, por estarem mais expostas se mostraram mais sensíveis à ação dos óleos voláteis.

Os resultados observados mostram que as plântulas em seu início de desenvolvimento são mais afetadas pela ação dos óleos voláteis, uma vez que a perda de biomassa no início do seu desenvolvimento, juntamente com a baixa atividade respiratória, diminuição do crescimento da raiz/parte aérea, indicam um desequilíbrio na rota das pentoses, uma vez que esta é a rota alternativa responsável pelo suprimento de esqueletos de carbono que serão utilizados para

suprir o gasto energético no crescimento das plantas. Estes efeitos já foram reportados por Gniazdowska e Bogatek (2005), sendo demonstrado que algumas substâncias podem reduzir a atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes.

Os maiores efeitos no crescimento do hipocótilo/mesocótilo, em relação à raiz, pode ter ocorrido devido à absorção e, conseqüentemente, à concentração das fitotoxinas nos tecidos ser favorecida pela volatilização dos óleos presentes no substrato com o hipocótilo/mesocótilo, uma vez que os discos de papéis filtro impregnados com os óleos voláteis foram fixados nas tampas das placas de petri.

A atividade fitotóxicas de polisulfetos cíclicos na germinação e crescimento inicial foram reportados para as espécies *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Licopersicum esculentum* e *Acacia farnesiana*, sendo verificada a ação alelopática através da inibição no crescimento da raiz primária e hipocótilo (LANE *et al.*, 2004).

Com o aumento das concentrações dos óleos, o índice mitótico foi continuamente reduzido (Figura 38 A,B), sendo o maior efeito depressivo verificado na maior concentração em que o índice mitótico atingiu mais do que 90% de inibição na divisão celular para a concentração de 1,0%, ( $\pm 84\%$  em *I. cordifolia* e  $\pm 81\%$  em *B. decumbens*) quando comparado ao controle, o que justifica a redução na massa final de ambas as espécies.

Comparando-se as freqüências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento, é evidente a maior freqüência de prófase e menor freqüência das outras fases subseqüentes. Para *I. cordifolia*, foi verificado uma diminuição superior a 50% para as fases da prófase e metáfase. Em *B. decumbens*, tal redução foi verificada somente para a prófase, sendo os maiores valores de inibição observados para a fase de telófase, com reduções de  $\pm 84\%$  para a concentração de 1,0%, onde valores superiores a 50% também foram observados para as concentrações de 0,5% (76%) e 0,25% (66%) em relação ao controle (figura 38 C,D ).

Meristemas de *I. cordifolia* tratados com os óleos voláteis de *M. foetidus* na concentração mais elevada causaram uma proporção reduzida de células em profase durante a germinação (figura 38 E). Em *I. cordifolia* a proporção de células metafásicas diminuíram em todas as concentrações e quando isso ocorreu, houve aumento de anormalidades como aderência na metáfase (figura 38 F).



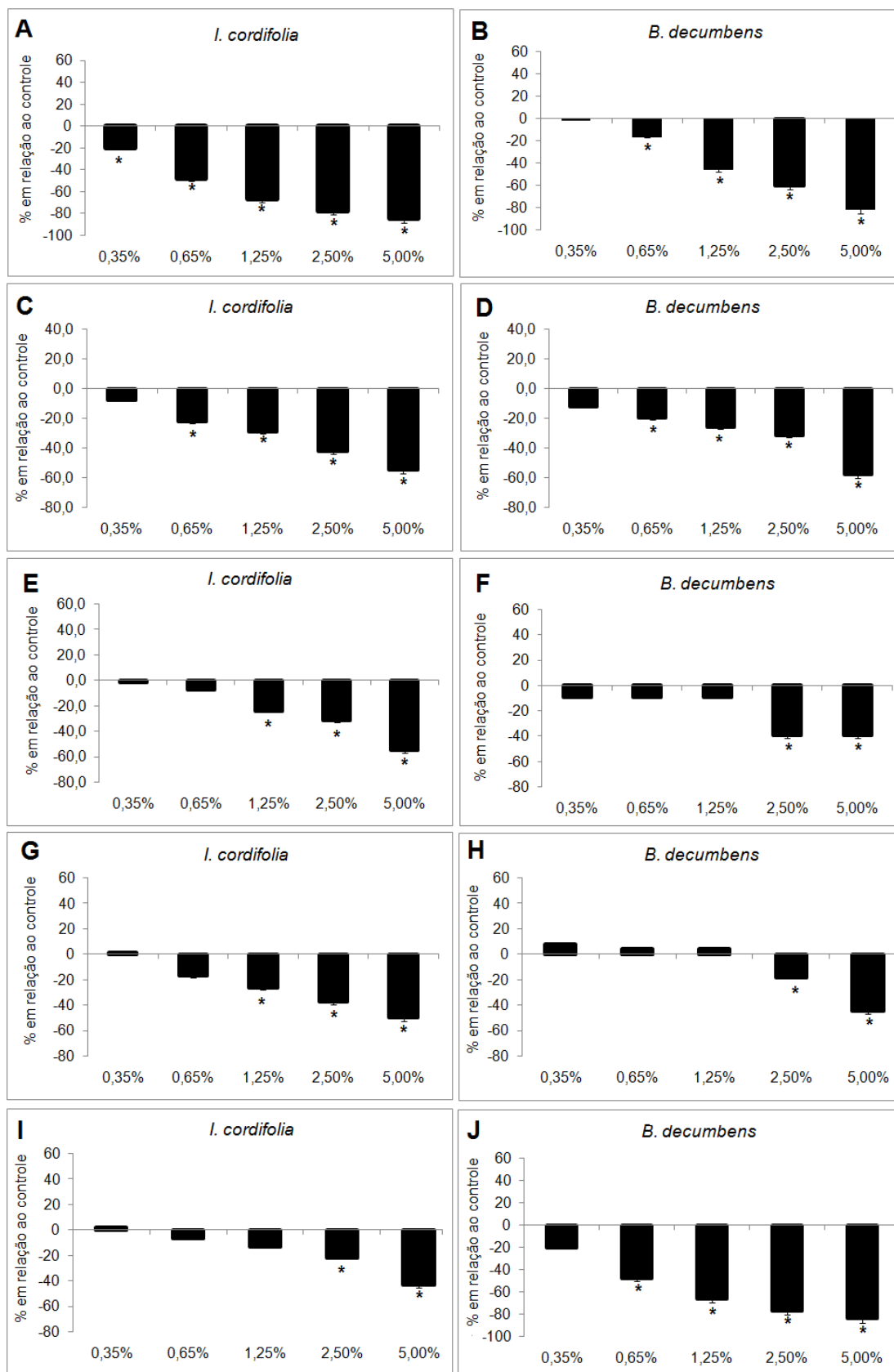


FIGURA 38. NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (A,B), PROFASE (C,D), METAFASE (E,F), ANAFASE (G,H) E TELOFASE (I,J) EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES *I. cordifolia* E *B. decumbens*, EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus*. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Para *B. decumbens*, a redução acentuada ocorreu a partir da metáfase, prosseguindo nas fases de anáfase e telófase. A proporção de células em anáfase-telófase diminuiu sob as mesmas condições nos óleos testados (figura 38 H,J). Quando tratados com os óleos voláteis, uma vasta gama de anormalidades ocorreu como telófase com pontes cromossômicas, pontes na anáfase e brotos nucleares na profase em *I. cordifolia* (tabela 16, figura 39) e Telófase e anáfase com pontes cromossômicas, aderência cromossômica na telófase, micronúcleos em prófase e brotos nucleares em profase em *B. decumbens* (tabela 13, figura 38).

O crescimento celular em plantas depende de um processo de mitose normal. Os efeitos limitativos no crescimento como vários tipos de estresse têm sido relatados como fatores no controle da divisão celular (DING *et al.*, 2010). A divisão uniforme de todos os componentes celulares permite um crescimento equilibrado para o organismo (REIGOSA *et al.* 2006).

As concentrações mais elevadas dos óleos voláteis causaram a inibição da atividade mitótica. Foram encontrados resultados consistentes entre a inibição do crescimento da raiz e uma redução no IM às concentrações mais elevadas em óleo essenciais testados (SCHMIDT-SILVA *et al.*, 2011). O índice de alterações para raízes tratadas foi significativamente mais baixo do que o do controle, indicando alterações no crescimento e desenvolvimento das plantas expostas como um resultado de uma ação química (HOSHINA; MARIN MORALES, 2009).

O controle da progressão do ciclo celular e o número de células em divisão vão definir o crescimento e morfogênese da planta, e qualquer alteração da temporização precisa e a ordem desses eventos irá atuar como um fator crítico no desenvolvimento da planta (REIGOSA *et al.*, 2006). O desenvolvimento das plantas tem estágios decisivos que são muito vulneráveis, como a germinação de sementes, o que é importante a ter em conta quando se estuda no crescimento das plântulas.

TABELA 16. FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DAS RAÍZES DE *I. cordifolia*, EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS DE *M. foetidus* DURANTE 24 HORAS.

Tipo de alteração*	<i>I. cordifolia</i>						<i>B. decumbens</i>				
	Controle	0.35%	0.65%	1.25%	2.50%	5.00%	Controle	0.35%	0.65%	1.25%	2.50%
<b>I.A.C.</b>	2,20±0,33	3,80±,12*	4,26±1,56*	5,12±1,78*	7,68±1,22*	8,86±0,26*	1,80±0,56	4,30±1,15*	5,20±1,13*	6,80±2,36*	8,30±1,35*
<b>C- M.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,23±0,55*	1,55±0,67*	2,22±0,55*	0,00±0,00	0,80±0,38*	0,80±0,65*	1,33±1,15*	1,68±0,12*
<b>P.C.P.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,02±0,88*	1,33±0,52*	1,67±1,72*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±1,00	1,50±1,10*	2,66±1,25*
<b>P.M.</b>	0,00±0,00	1,33±1,27*	1,66±1,10*	2,50±1,76*	3,33±1,77*	4,66±1,24*	0,00±0,00	0,70±0,67	1,02±0,56*	1,33±1,2*	1,70±1,23*
<b>C.N.A.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,66±1,25	1,33±1,27*	1,33±1,10*	2,66±1,00*
<b>M.A.</b>	0,67±0,24	1,33±0,76*	1,66±0,55*	2,22±1,00*	2,88±1,12*	3,33±0,55*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,88±1,25
<b>T.P.C.</b>	1,66±1,00	2,33±1,17*	3,18±1,23*	3,75±0,12*	4,33±0,67*	5,46±1,08*	0,00±0,00	1,02±0,67*	1,33±1,52*	1,70±0,23*	2,66±0,77*
<b>M.A.</b>	0,80±0,24	1,33±1,55	2,00±0,17*	2,45±0,67*	3,33±0,67*	4,33±1,14*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>P.C.A.</b>	1,33±0,67	2,33±1,10*	3,50±1,17*	4,67±1,17*	5,33±1,22*	6,68±1,00*	1,02±0,24	2,10±1,22*	3,23±0,57*	4,56±1,25*	4,70±1,55*
<b>C.N.D.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,57	0,70±0,68	1,33±1,52*	1,66±0,92*
<b>C.P.</b>	0,33±0,55	1,50±1,27	2,30±1,62*	3,33±1,62*	4,00±0,55*	4,33±1,27*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>P.C.A.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,17	1,00±0,00*	2,33±1,17*	0,00±0,00	0,33±0,55	0,33±0,53	0,33±0,53	1,33±1,52*
<b>P.C.T.</b>	1,33±1,52	1,33±1,52	1,66±1,14	1,88±0,88*	2,33±1,16*	3,33±1,20*	2,66±1,00	3,33±1,01*	4,68±1,45*	5,88±1,15*	5,76±1,15*
<b>D.C.T.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,05	1,66±1,12*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,66±0,22	2,66±0,25*
<b>M.P.</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,66±1,15	1,33±1,50*	1,68±1,25*	2,33±1,15*	3,33±1,54*
<b>B.P</b>	0,00±0,00	0,33±0,17	0,66±1,15	1,50±0,83*	2,33±0,62*	3,33±1,50*	2,66±0,57	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±1,72*	3,33±1,27*
<b>C- M.</b>	2,20±0,50	1,66±0,87*	1,66±1,28*	2,33±1,15	3,14±1,27*	5,66±0,17*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Nota: Índice de alterações cromossômicas (**I.A.C.**); C- mitose (**C- M.**); perturbação do eixo cromossômico na profase (**P.C.P.**); Micronúcleo na profase (**M.P.**); célula com núcleo amebóide (**C.N.A.**); metáfase com aderência (**M.A.**); telófase com ponte cromossômica (**T.P.C.**); anáfase multipolar (**A.M.**); pontes cromossômicas na anáfase (**P.C.A.**); célula com núcleo deformado (**C.N.D.**); célula polinucleada (**C.P.**); pontes cromossômicas na anáfase (**P.C.A.**); pontes cromossômicas na telófase (**P.C.T.**); B.P: brotos na prófase. \*Media difere estatisticamente em relação ao controle pelo teste de Dunnet (p < 0.05).

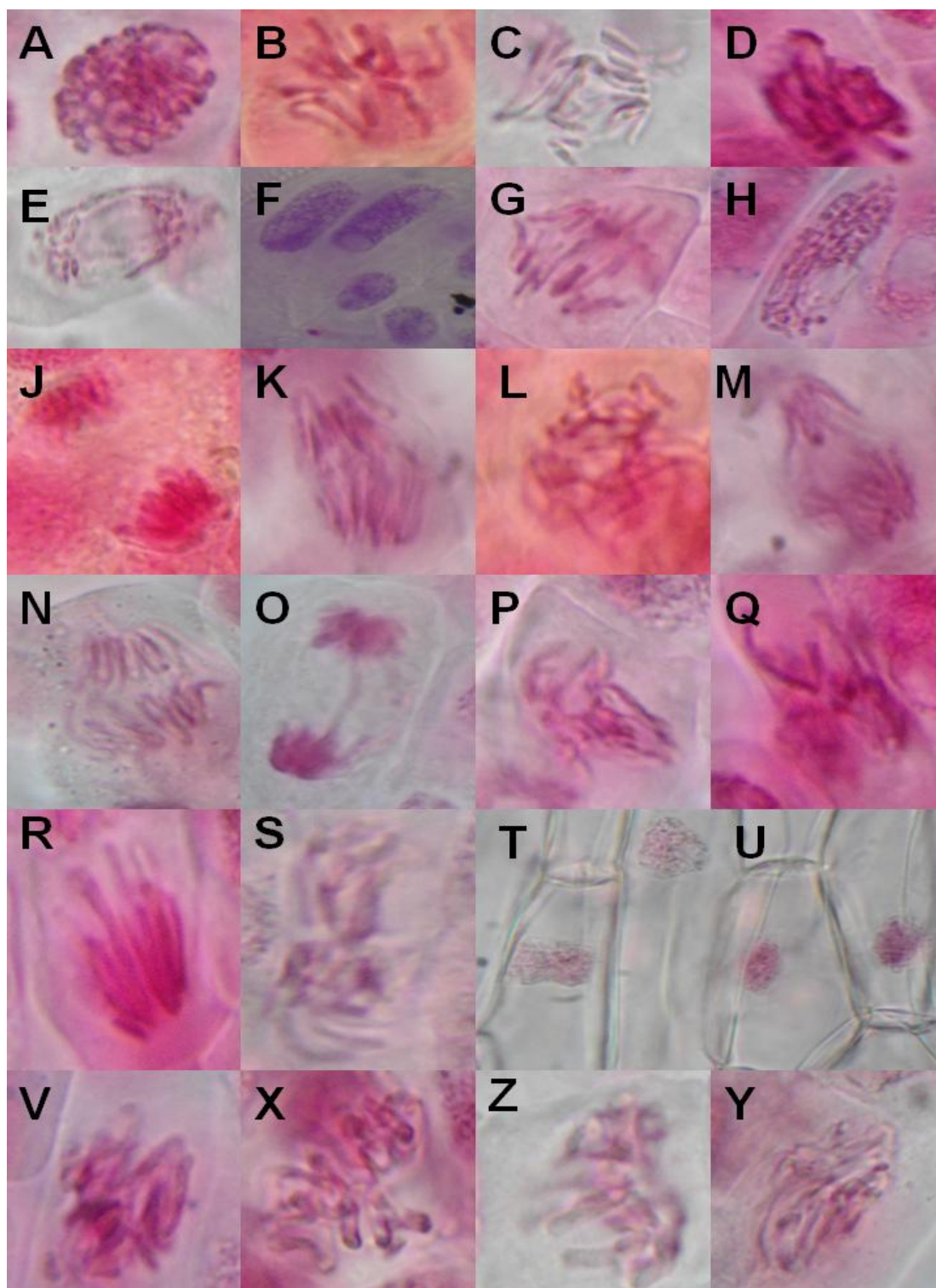


FIGURA 39. EFEITOS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CELULARES EM *I. cordifolia* -PRÓFASE NORMAL (A), C-MITOSE (B), QUEBRA CROMOSSÔMICA (C), METÁFASE PEGAJOSA (D), ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA (E), CÉLULA POLINUCLEADA (F), ANÁFASE MULTIPOLAR (G), NÚCLEO DISFORME (H)- E *B. decumbens*- TELÓFASE NORMAL (J), ANÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA (K), C- MITOSE (L), ANÁFASE NORMAL (M), ANÁFASE COM PERDA DE FILAMENTO CROMOSSÔMICO (N), TELÓFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA (O), PRÓFASE COM ADERÊNCIA CROMOSSÔMICA (P,Q), METÁFASE PEGAJOSA (R), ANÁFASE PEGAJOSA (S), CÉLULAS EM APOPTOSE (T,U), CÉLULA POLIPLÓIDE (V, X, P).

#### 5.9.6 EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NO ESTRESSE OXIDATIVO DE *I. cordifolia* E *B. decumbens* EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO

Na avaliação do teor de clorofila e respiração, foi observada acentuada diminuição dessas atividades, em função das concentrações avaliadas, para ambas as espécies testadas. O decréscimo da taxa de clorofila em *I. cordifolia* e *B. decumbens* ocorreu em função das concentrações ensaiadas. Tal decréscimo foi de 6,2  $\mu\text{g.mL}$  em *I. cordifolia* e 7,3  $\mu\text{g.mL}$  em *B. decumbens*, evidenciando maior sensibilidade aos óleos voláteis pela espécie *I. cordifolia* quando comparada a *B. decumbens* (figura 40 A).

*I. cordifolia* demonstrou ser mais sensível aos aleloquímicos quando avaliado o seu teor de clorofila, enquanto que *B. decumbens* demonstrou ter mais sensibilidade quando se avalia o processo respiratório (0,109 nm) sendo que estes resultados justificam a maior redução na parte subterrânea, uma vez que o efeito inibitório nas raízes também pode levar à diminuição na respiração das raízes (figura 40 B).

Quando se observa a atividade respiratória e teor de clorofila nas plântulas cultivadas em casa de vegetação, verificou-se que os óleos afetaram ambas as espécies de maneira similar, e somente as maiores concentrações causaram efeitos inibitórios no teor de clorofila (6,9  $\mu\text{g.mL}$  para *I. cordifolia* e 7,1  $\mu\text{g.mL}$  para *B. decumbens* na concentração de 5,0%) e atividade respiratória (22,7 nm para *I. cordifolia* e 13,4 nm para *B. decumbens* na concentração de 5,0%), como demonstrado na figuras 41 (A e B).

As concentrações dos óleos causaram aumento nas proteínas totais solúveis presentes em *I. cordifolia* e *B. decumbens* em laboratório, com aumentos de 25,70  $\mu\text{g.g}^{-1}$  em *I. cordifolia* e 23,44  $\mu\text{g.g}^{-1}$  em *B. decumbens*, sendo verificado que para ambas as espécies, *I. cordifolia* foi mais sensível que *B. decumbens* (figura 40 B). Nos experimentos conduzidos em casa de vegetação, observou-se que apenas as maiores concentrações induziram o aumento de proteínas totais solúveis, sendo também observada a maior sensibilidade de *I. cordifolia* (6,87  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em relação à *B. decumbens* (6,12  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) (figura 41 B).

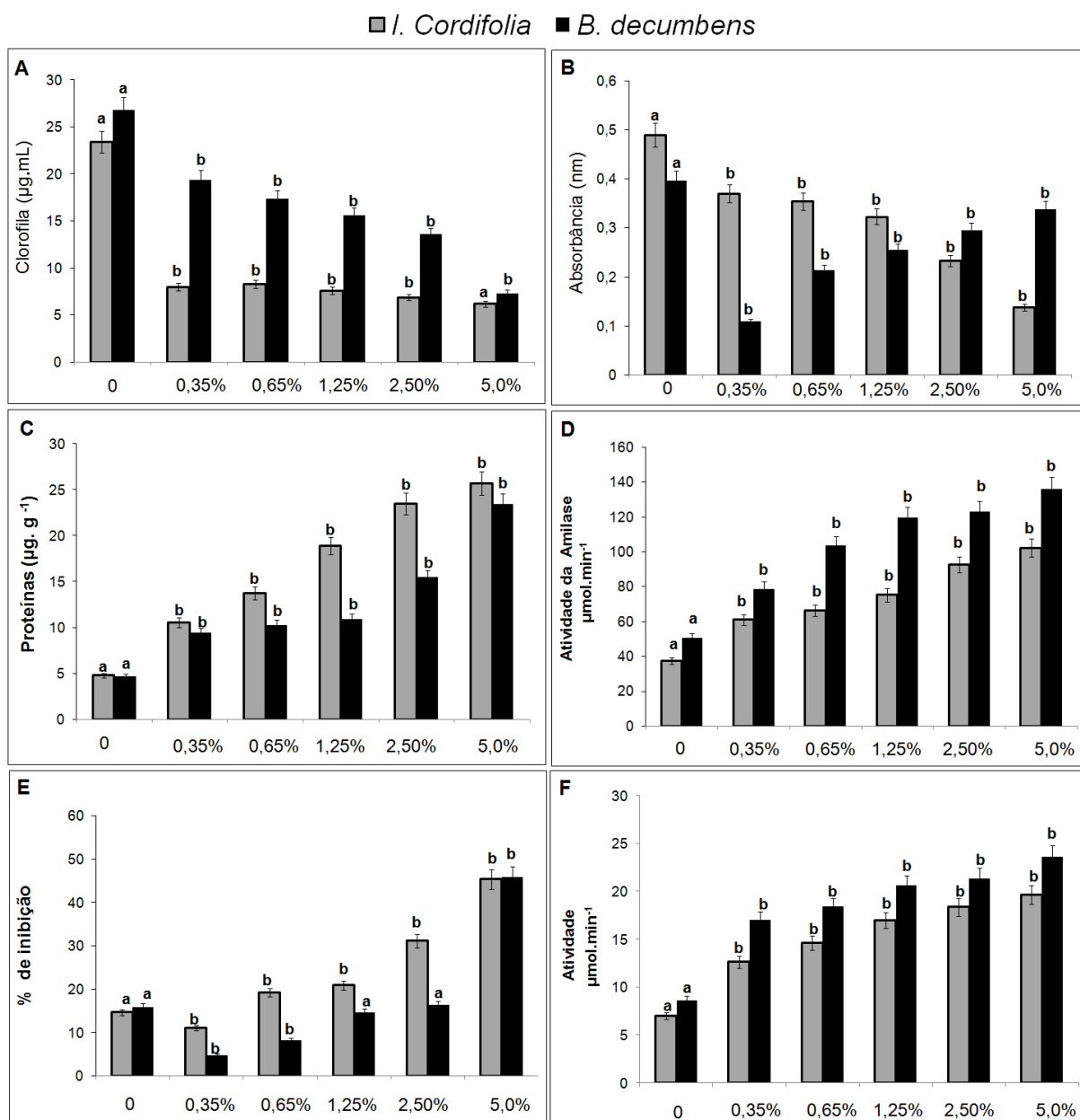


FIGURA 40. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Microlobius foetidus* NO TEOR DE CLOROFILA (A), SÍNTESE DE FORMAZAN (B), PROTEÍNAS TOTAIS (C), A-AMILASE (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E POLIFENOLOXIDASE (F) EM PLÂNTULAS DE *I. cordifolia* E *B. decumbens* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

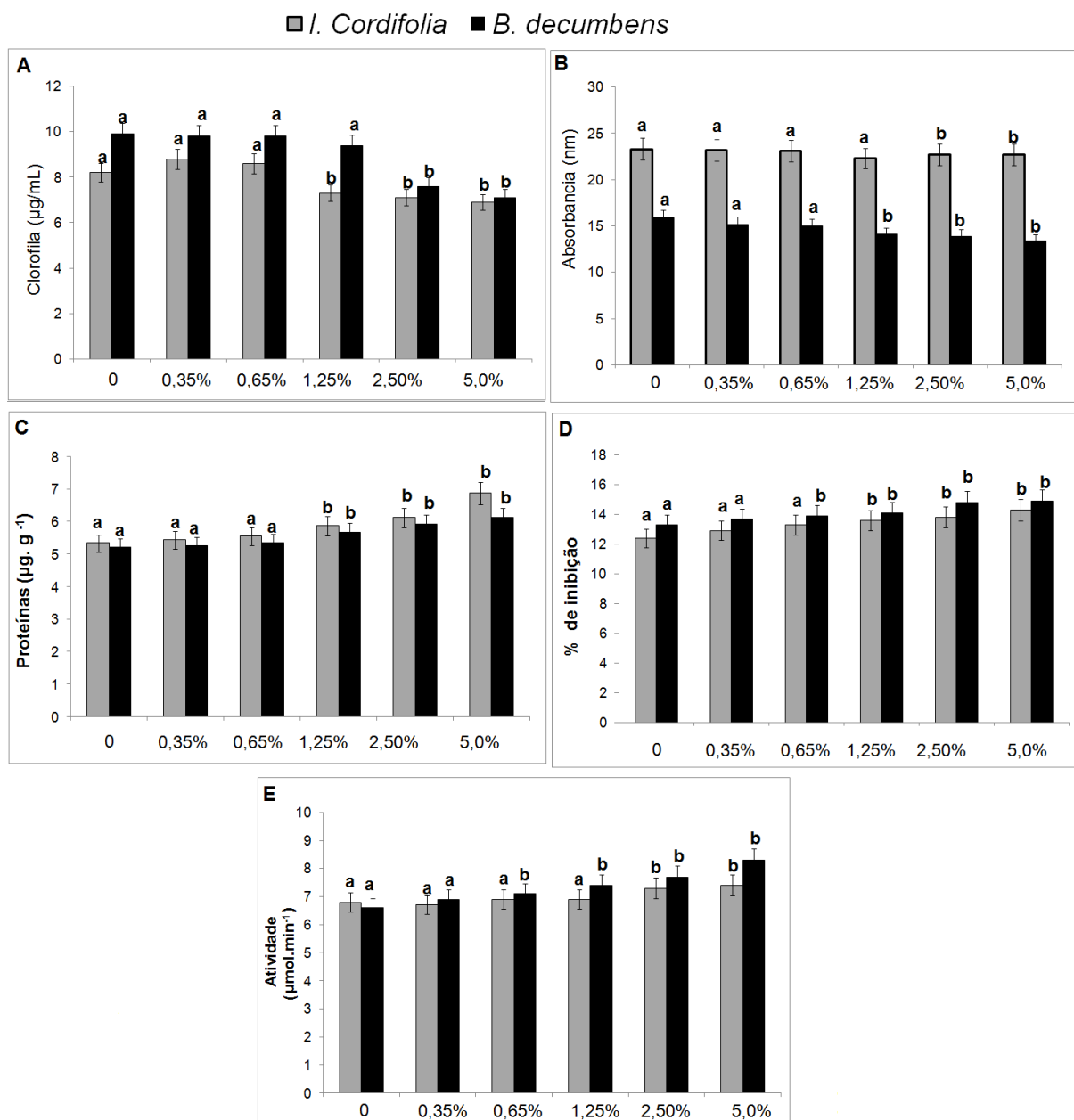


FIGURA 41. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Microlobius foetidus* NO TEOR DE CLOROFILA (A), SÍNTESE DE FORMAZAN (B), PROTEÍNAS TOTAIS (C), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E POLIFENOLOXIDASE (F) EM PLÂNTULAS DE *I. cordifolia* E *B. decumbens* EM LABORATÓRIO. \*MEDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

A diminuição na porcentagem final de germinação indica que os óleos voláteis afetaram ao gasto energético de *I. cordifolia* e *B. decumbens*, durante o seu desenvolvimento. No controle é observado um baixo nível da  $\alpha$ -amilase, indicando que houve o gasto energético necessário ao desenvolvimento das plântulas. Para as espécies tratadas com os óleos voláteis, é observado que há um aumento no nível destas enzimas, sendo observado que *B. decumbens* obteve os maiores níveis da  $\alpha$ -amilase ( $136 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ), o que corrobora com os efeitos observados sobre a germinação e crescimento (Figuras 35 e 36).

A avaliação da atividade da  $\alpha$ -amilase não foi mensurada em casa de vegetação, uma vez que no início do desenvolvimento, a planta já consumiu todo o seu material de reserva. As observações em laboratório mostraram que, após as primeiras 48 horas de incubação, de plântulas de *I. cordifolia* e 72 horas em *B. decumbens*, foi possível observar os primeiros folíolos visíveis, indicando que o atraso no processo fotossintético está relacionado ao atraso no gasto energético das plântulas, além da baixa contribuição da respiração para o metabolismo energético aos a germinação. Com relação à defesa antioxidante, foram verificados estímulos nas respostas enzimáticas, com aumento da concentração de MDA causado pela peroxidação lipídica (Figura 40 E).

Para *I. cordifolia* verificamos o aumento da concentração de MDA em todas as concentrações utilizadas, com aumento superior a 3 vezes da concentração observada para o controle (45%) na concentração de 5,0%. Efeito similar foi observado para *B. decumbens*. Entretanto, apenas a concentração de 5,0% causou acúmulo significativo de MDA em 46%, e para as concentrações de 0,65% e 0,35% houve decréscimo na produção de MDA (8,3% e 4%, respectivamente), indicando uma baixa taxa de peroxidação quando comparado ao controle (16%) em casa de vegetação (figura 40 E).

No desenvolvimento das plântulas em casa de vegetação, foi observado que a concentração de MDA foi menor do que nas plântulas tratadas em laboratório, indicando que os efeitos são mais intensos no início do crescimento. *I. cordifolia* e *B. decumbens* tiveram respostas similares, com 14,3% (*I. cordifolia*) e 14,9% (*B. decumbens*) para a concentração de 5,0% (figura 41 D). Alterações nos níveis enzimáticos também foram observadas para a polifenoloxidase, com aumento nas concentrações para ambas as espécies. Os óleos voláteis estimularam em 2x o nível



de polifenoloxidase em  $12,66 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  em *I. cordifolia* e  $17,04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  em *B. decumbens* na menor concentração de 0,05%. Para as maiores concentrações, o aumento foi de  $19,65 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  em *I. cordifolia* e  $23,63 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  para *B. decumbens*, demonstrando a sensibilidade dos óleos voláteis para as duas espécies testadas (figura 40 F).

Somente as concentrações de 2,5% e 5,0% estimularam a produção da polifenoloxidase nas plântulas de *I. cordifolia* cultivadas em casa de vegetação. Para a maior concentração avaliada, *B. decumbens* apresentou uma taxa de estímulo de  $8,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ , superior a  $7,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  observado para *I. cordifolia* (figura 41). A atividade da polifenoloxidase e indução de defesa de plantas apresentou resultados variados em relação ao papel desta enzima, que foi dependente da idade das plantas aqui avaliadas. Entretanto, os ensaios levam a crer que esta enzima, quando comparada com a peroxidase, tem participação secundária no processo de defesa.

Os resultados aqui apresentados mostram que, além de afetar na germinação, crescimento e desenvolvimento das espécies testadas, as concentrações dos óleos causaram alterações no teor de clorofila total e atividade respiratória, sendo esta diminuição proporcional ao aumento da concentração utilizada. Nossos resultados revelam que após a conclusão de germinação, houve uma diminuição da atividade respiratória em plântulas de *I. cordifolia* e *B. decumbens* e que estes resultados representam, provavelmente, uma diminuição na demanda ATP após a conclusão de germinação.

Um padrão semelhante de alterações na atividade respiratória foi observada em outras duas espécies de ervas daninhas, *Bidens pilosa* L. (PERGO *et al.*, 2008) e *Euphorbia heterophylla* L. (KERN *et al.*, 2009) em estudos conduzidos com substâncias com atividade alelopática conhecidas como o  $\alpha$ - pineno e cumarinas. Algumas classes de substâncias inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (BLUM; REBBECK 1989; BAZIRAMAKENGA *et al.* 1994; CHOU 1999), onde a aparência clorótica nas folhas é considerada um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos são efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (DUKE 1985; CAYON *et al.* 1990).

Proteínas protetoras podem ser induzidas em resposta a infecção, dano ou pregação. Sua produção está relacionadas à defesa e uma resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada (SHEWRY; LUCAS, 1997; DE WIT, 2007). Assim, os efeitos ocorrem através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática, danos a macromoléculas, entre outros. O organismo então é capaz de responder, inicialmente a nível molecular e celular, a fim de evitar ou diminuir o efeito tóxico destes contaminantes através de respostas adaptativas. Caso estas respostas não sejam suficientes, poderá ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais ou a morte. Entretanto, a total adaptação pode ser alcançada caso as respostas desenvolvidas pelos organismos sejam eficientes para contrabalancear os distúrbios (FENT, 2004).

Os resultados aqui obtidos mostram que os óleos voláteis causam aumento no estresse oxidativo nas espécies avaliadas, uma vez que interfere na produção das enzimas com papel antioxidante em vegetais. Os efeitos foram mais pronunciados nas plântulas em início do desenvolvimento, evidenciando que logo após embebição da semente, os óleos afetaram o início do processo respiratório, uma vez que afetou a quebra da molécula de amido, o que foi evidenciado pela alta atividade da  $\alpha$ -amilase no início do desenvolvimento do embrião. As concentrações dos óleos voláteis também interferiram no gasto energético, uma vez que foi detectado aumento nos níveis de  $\alpha$ -amilase para *I. cordifolia* e *B. decumbens*. O processo germinativo depende da atividade das  $\alpha$ -amilases que regulam a degradação de amido necessária para o suprimento do metabolismo (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

Enzimas como a  $\alpha$ -amilase possuem uma relação entre redução na velocidade de germinação e porcentagem final de germinação, uma vez que a  $\alpha$ -amilase, é produzida pela camada de aleurona em resposta à ação das giberelinas, sendo liberada dentro do endosperma onde causa a conversão de amido em açúcares, utilizados no crescimento do embrião (ARTECA, 1995). Nolan e Ho (1988) verificaram redução na atividade de  $\alpha$ -amilase em sementes de aveia tratadas com ABA. Segundo estes autores, este hormônio poderia estar agindo no sentido de evitar que a giberelina suprimisse a síntese de proteína, que causaria a desestabilização do mRNA responsável pela síntese de  $\alpha$ -amilase.

Outros sintomas de estresse como peroxidação lipídica também foram observadas, onde os maiores sintomas ocorreram para *I. cordifolia*, e é plausível que esta tenha contribuído para a redução do crescimento das plantas. Acredita-se que a peroxidação lipídica ocorre juntamente com a respiração durante a germinação de sementes, quando o teor de umidade é superior a 0,25 g por g de H<sub>2</sub>O de matéria seca (STANIEK; NOHL, 2000), levando à ativação da lipoxigenase como uma resposta imediata às mudanças na estrutura da membrana celular induzida pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (PERGO; ISHI-IWAMOTO 2011; BAKER; ORLANDI 1995; THALER 1999, PORTA; ROCHA-SOSA, 2002; BLOKHIN *et al.*, 2003).

No cerrado, gramíneas C<sub>4</sub> são predominantes e apresentam uma adaptação no processo de fotossíntese, que lhes confere maior produtividade em temperaturas altas e baixos teores de CO<sub>2</sub> (CHRISTIN *et al.* 2008), portanto são bem adaptadas e apresentam uma íntima relação com a dinâmica de queimadas nesses ambientes. A ausência de gramíneas no ambiente em que *M. foetidus* predomina, é um indício do estresse oxidativo causado pela liberação dos óleos voláteis, que uma vez lançados no ambiente, causam alterações na defesa antioxidante das espécies em competição, eliminando a concorrência nas áreas onde *Microlobius* é predominante.

#### 5.9.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR EM LABORATÓRIO

A análise dos efeitos alelopáticos de *A. extraaxillaris* e sobre a germinação de *I. cordifolia* indicou que a intensidade dos efeitos variou em função da parte morfológica utilizada e concentração. Os resultados mostram que o óleo de *A. extraaxillaris*, atrasou a germinação de sementes de *I. cordifolia* em todas as concentrações ensaiadas. Entretanto, esse atraso não afetou a porcentagem final de germinação na concentração de 10 mg. As demais concentrações afetaram a % final de germinação, sendo as maiores efeitos verificados para a concentração de 50 mg das raízes (tabela 17).

TABELA 17. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

Índice de velocidade de germinação (IVG)		
n = 4 repetições	raízes	folhas
Controle	7,34±3,36	7,34±3,36
10 mg	6,1±1,33*	6,78 ±1,17*
25 mg	5,4±2,37*	6,11±1,26*
50 mg	4,9±1,89*	5,1±2,65*
% de germinação (%G)		
n = 4 repetições	raízes	folhas
Controle	94±2,33	94±2,33
10 mg	92±2,47 <sup>ns</sup>	94±1,17 <sup>ns</sup>
25 mg	80±1,28*	90±2,37*
50 mg	74±1,12*	86±1,22*

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>NS</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

Em plântulas submetidas as concentrações das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também demonstraram potencial alelopático, atuando no atraso da germinação e porcentagem de germinação em sementes de *I. cordifolia*. Para as folhas de *M. foetidus*, apenas a concentração de 50 mg atrasaram a germinação (6,09). Quando avaliamos as demais partes morfológicas, é verificado que os frutos tiveram maior efeito quando comparados as cascas e sementes, com atrasos na germinação de 3,77 e 4,12 para as concentrações de 50 mg e 25 mg, respectivamente (tabela 18).

Efeitos fisiológicos ocasionados por interações alelopáticas, frequentemente observados, são inibição da porcentagem e velocidade da germinação e na redução do crescimento inicial, sendo estes respostas secundárias de efeitos primários que ocorrem no processo metabólico das plantas afetadas (PEDROL *et al.*, 2006).

TABELA 18. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *Microlobius foetidus* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

Índice de velocidade de germinação (IVG)				
	Controle	10 mg	25 mg	50mg
<b>Folhas</b>	7,34±1,33	7,22±2,57 <sup>ns</sup>	7,14±1,79 <sup>ns</sup>	6,09±1,17*
<b>Cascas</b>	7,34±1,33	6,26±1,29 *	6,12±2,33*	5,54±1,22*
<b>Frutos</b>	7,34±1,33	5,78±1,17*	4,12±2,77*	3,77±1,87*
<b>Sementes</b>	7,34±1,33	6,01±2,36*	5,87±1,28*	5,33±1,17*
% de germinação (%G)				
	Controle	10 mg	25 mg	50mg
<b>Folhas</b>	92±1,25	88±1,22*	88±1,17*	80±1,87*
<b>Cascas</b>	92±1,25	84±1,25*	78±1,12*	78±2,78*
<b>Frutos</b>	92±1,25	76±1,67*	72±1,67*	64±2,12*
<b>Sementes</b>	92±1,25	60 ±1,22*	58±2,33*	53±13,21*

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

A intensidade de inibição foi diretamente relacionada à quantidade de material utilizado, sendo os efeitos mais intensos observados na presença de 50 mg das raízes com inibição da raiz primária de *I. cordifolia* em ±54,3%. O lixiviado das folhas de *A. extraaxillaris* não se mostraram tão eficazes na inibição do crescimento de *I. cordifolia*. A maior concentração causou inibição de 33,5% (figura 42 A).

No crescimento do hipocótilo foi verificado que as folhas de *A. extraaxillaris* nas concentrações ensaiadas não foram suficientes para inibir o crescimento. As raízes causaram inibição de ±71,26% para a concentração de 50 mg, sendo as demais concentrações também significativas. Neste ensaio, foi verificada a relação dose-dependente das folhas e raízes na inibição da germinação e crescimento (figura 42 B).

É possível que a atividade observada para as sementes em *I. cordifolia* tenha ocorrido em função da presença do ácido esteárico, considerado o constituinte majoritário da fração hexânica das sementes. MELOS *et al.*, (2007) cita que ácidos graxos de cadeia longa como o ácido esteárico podem atuar na germinação e inibição do crescimento de plântulas em laboratório.

A inibição da raiz primária de *I. cordifolia* exposta à diferentes concentrações das partes morfológicas de *M. foetidus* também foi verificada. Somente as cascas não afetaram o crescimento da raiz, e para as folhas, apenas as concentrações de 25 e 50 mg reduziram a raiz de *I. cordifolia* em 32,1% e 46,7%. Efeitos mais acentuados foram verificados para os frutos com inibições de 58% na concentração de 50 mg. A maior concentração das sementes também foi capaz de inibir o crescimento da raiz em 51,2% (figura 42 C). Efeito similar foi observado para o crescimento do hipocótilo. Somente concentração de 50 mg dos frutos foi capaz de inibir o crescimento em valores superiores a 50% (52,7%) (figura 42 D).

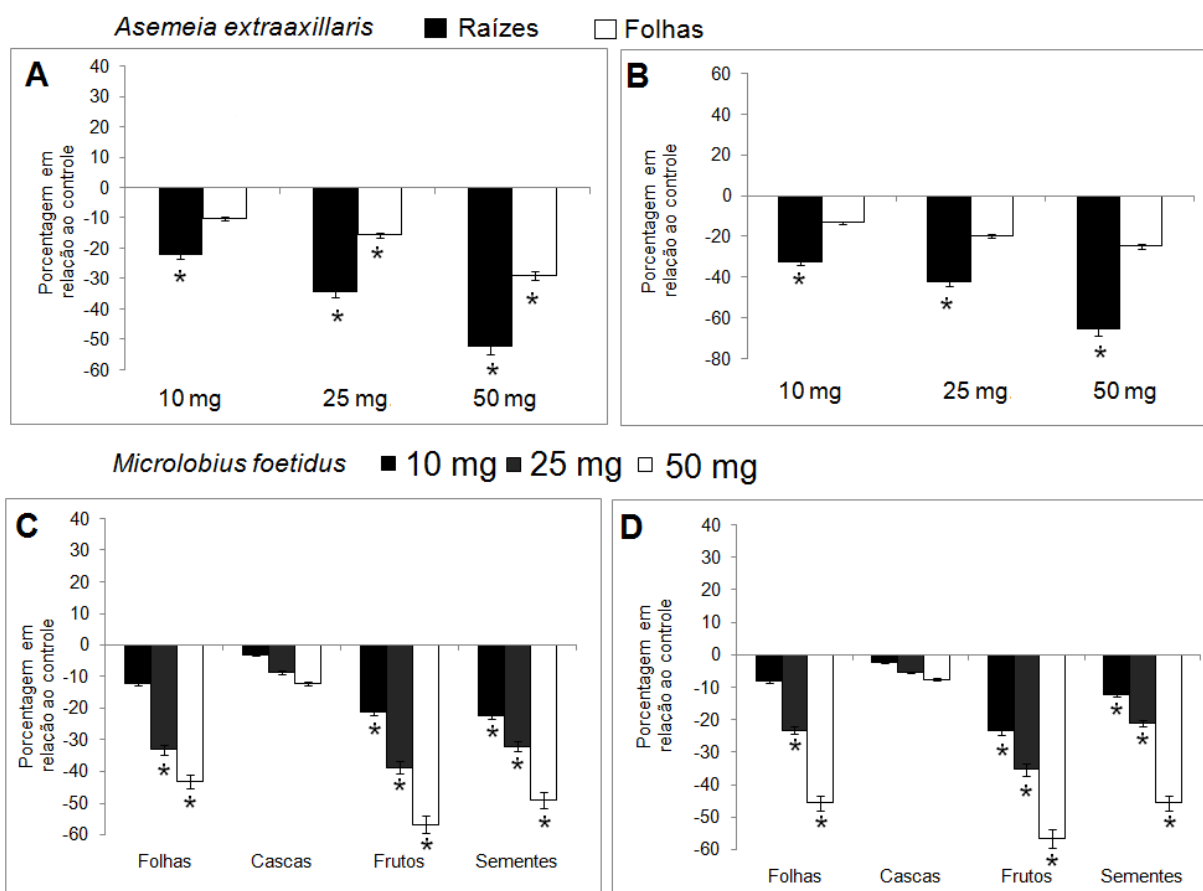


FIGURA 42 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris*, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE O CRESCIMENTO DA RAIZ (A, C) E HIPOCÓTILO (B,D) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Em estudos sobre a atividade alelopática de espécies de plantas pelo método de difusão em ágar, foi verificado que *A. fauriei* estimulou o crescimento de alface (FUJII *et al.* 2003). No mesmo trabalho, os autores verificaram efeito inibitório de espécies de várias famílias como, por exemplo, Amaryllidaceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Guttiferae, Icacinaceae, Leeaceae, Leguminosae, Meliaceae, entre outras, observando a inibição superior a 50%. Várias substâncias pertencentes às classes dos alcaloides, terpenos e compostos fenólicos já foram identificados como aleloquímicos liberados por outras plantas. Essas substâncias podem ser responsáveis, de modo isolado ou sinérgico, pela interferência nos processos fisiológicos durante a fase de germinação e crescimento da espécie-alvo (EINHELLIG, 2002).

#### 5.9.8 EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Na determinação do estresse oxidativo, foi verificado que os efeitos variaram de acordo com a parte morfológica e concentração avaliada. Na atividade da catalase, apenas a menor concentração das raízes (10 mg) não foi suficiente para provocar alterações na produção da catalase. As demais concentrações causaram aumento significativo em relação ao controle.

Efeito similar foi observado para as folhas, sendo que estes ocorreram com maior intensidade que os demais. As concentrações de 25 mg e 50 mg inibiram a produção da catalase em cerca de 25% e 50% ( $2,1 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  e  $1,7 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$ , respectivamente) (figura 43 A). Na produção da peroxidase houve significativa redução da atividade nas concentrações de 25 mg e 50 mg com redução significativa para as raízes ( $4,6 \mu\text{mol.tetraguaiacol.min}^{-1}$  e  $3,8 \mu\text{mol.tetraguaiacol.min}^{-1}$ ) (figura 43 B). O mesmo efeito foi verificado para a SOD e GSH, sendo verificadas reduções na produção destas enzimas antioxidantes (figura 43 C,D). Lee e Colaboradores (2001) quantificaram a atividade das enzimas SOD,

CAT, e GSH (Glutationa redutase) em plantas de arroz cultivadas com NaCl, observaram diminuição após 10 dias de exposição.

Ao avaliar o nível de peroxidação de lipídios foi possível constatar um aumento significativo no conteúdo de malondialdeído (MDA) nas concentrações de 25 e 50 mg para as folhas e raízes, apresentaram aumentos de 22,5% e 43,7% para as folhas e 21,3 % e 28,7% para as raízes, respectivamente (figura 43 E).

A atividade respiratória também foi afetada, sendo verificada redução na síntese de formazan nas concentrações de 25 e 50 mg para as raízes e folhas. Entretanto os efeitos para as concentrações das raízes foram mais intensos com valores de 0,277 e 0,236 nm respectivamente (figura 43 F).

Na atividade das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* sobre o estresse oxidativo de *I. cordifolia*, foi verificado que apenas a concentração de 50 mg das folhas aumentou a produção da catalase ( $3,9 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$ ) e a menor concentração também não foi significativa para os frutos e sementes, sendo verificada aumento da atividade para as plântulas submetidas as concentrações de 25 e 50 mg, com aumento de  $3,8 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  e  $4,7 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  para os frutos e  $3,3 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  e  $4,2 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  para as sementes (figura 44 A).

Na atividade da peroxidase, foi observado que as concentrações das cascas não alteraram a produção desta enzima antioxidante. As maiores concentrações das folhas e todas as concentrações dos frutos e sementes diminuíram o nível de peroxidase nas plântulas de *I. cordifolia* como observado para as plântulas submetidas as folhas e raízes de *A. extraaxillaris*. As maiores reduções foram verificadas para a concentração de 50 mg dos frutos, com  $3,2 \mu\text{mol.tetraguaiacol}.\text{min}^{-1}$ , seguido pelas sementes com  $3,6 \mu\text{mol.tetraguaiacol}.\text{min}^{-1}$  (figura 44 B).

Apenas os frutos e sementes foram capazes de afetar a produção da SOD com aumentos de  $5,9 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$  e  $5,4 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$  para a concentração de 50 mg, respectivamente (figura 44 C). Efeito similar foi observado para a produção da GSH. Somente a maior concentração das folhas foi capaz de aumentar a produção de GSH ( $3,1 \mu\text{mol.NADH}.\text{min}^{-1}$ ), e todas as concentrações dos frutos aumentaram os níveis de GSH, seguidos pelas duas maiores concentrações das sementes (figura 44 D). Similar à GSH, apenas os frutos aumentaram a peroxidação lipídica em todas as concentrações ensaiadas, com valores superiores a 50% de estímulo (figura 44 E).



Conforme observado para as plântulas de *I. cordifolia* submetidas as concentrações de *M. foetidus*, houve redução na respiração total das raízes, sendo observada diminuição na absorbância. A concentração de 50 mg dos frutos foi quem mais reduziu a respiração total de *I. cordifolia* (figura 44 F).

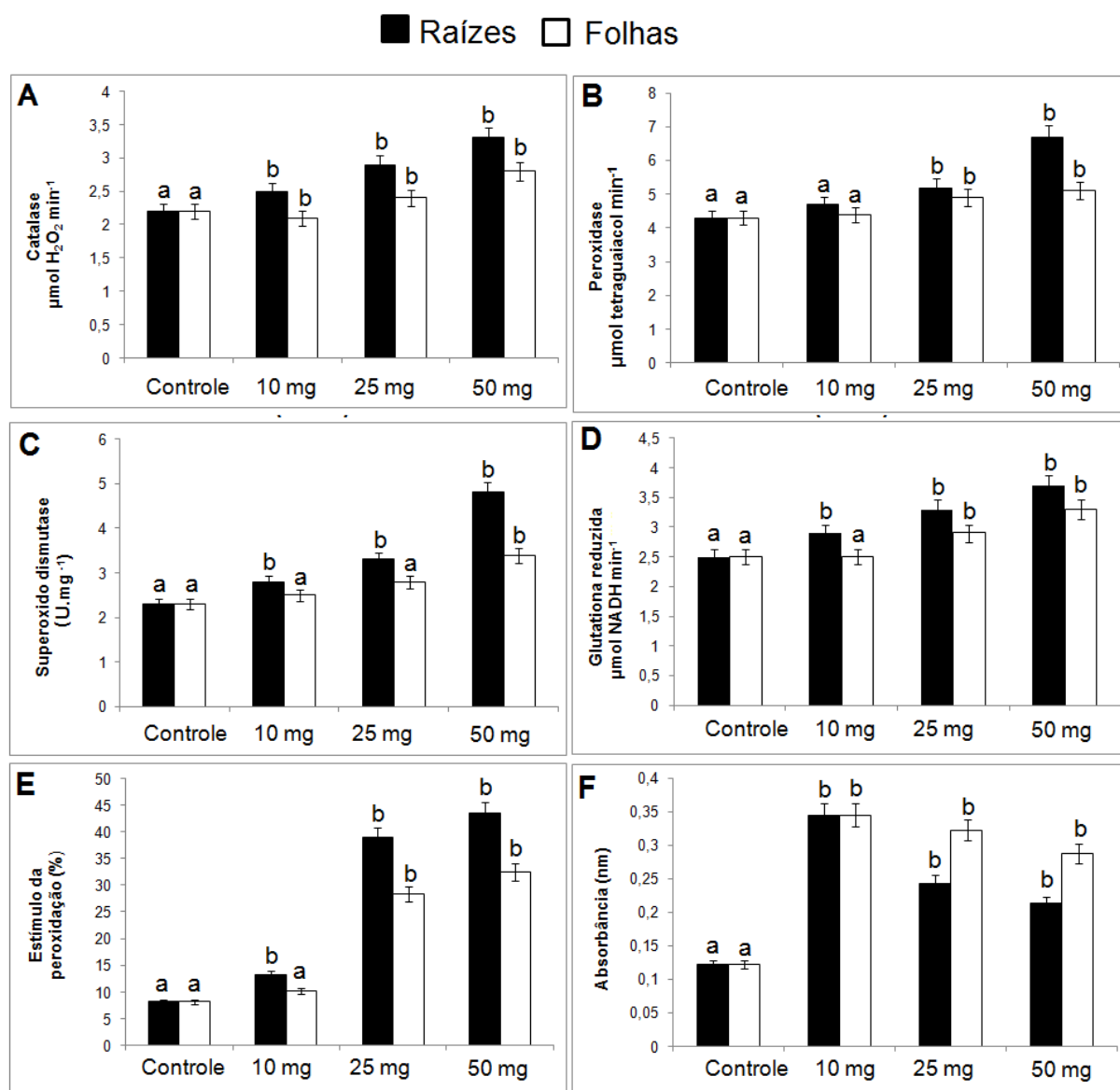


FIGURA 43. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

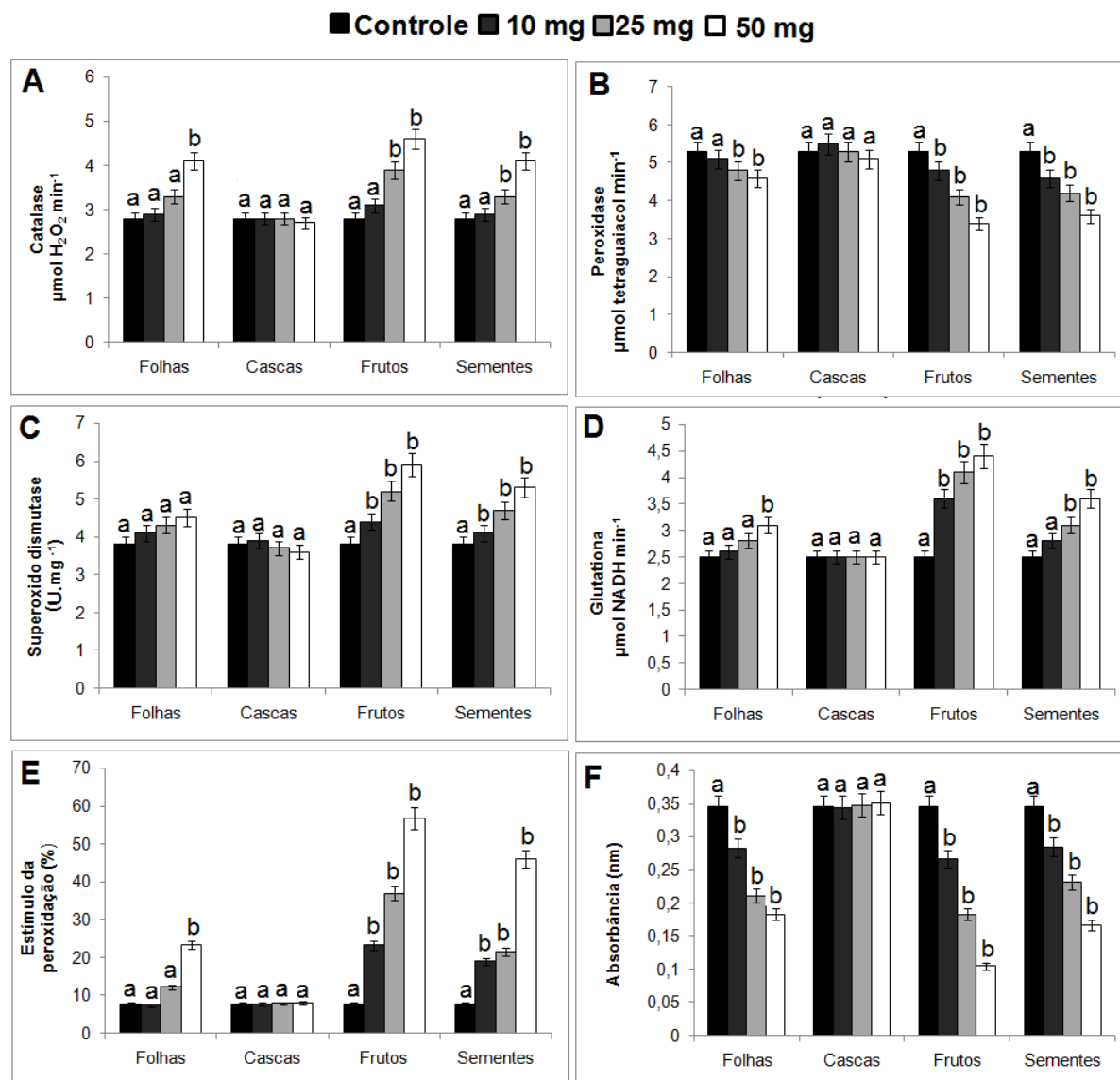


FIGURA 44. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *Microlobius foetidus* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

De acordo com Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade de algumas enzimas, como a catalase, indica que, em algumas plantas mantidas sob condições de estresse, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pode ser mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo pela ação de

enzimas antioxidantes. Esta afirmação pode justificar a baixa atividade enzimática e alta peroxidação lipídica observada neste trabalho.

#### 5.9.9 ATIVIDADE ALELOPÁTICA PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Na avaliação da atividade alelopática pelo método de lixiviados em casa de vegetação, foi verificado que os efeitos variaram em função da parte morfológica e concentração utilizada. As folhas de *A. extraaxillaris* atrasaram a emergência de *I. cordifolia* em todas as concentrações ensaiadas (0,51; 0,48 e 0,41 nas concentrações de 10, 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>), e para as raízes esse aumento só ocorreu para as concentrações de 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup> (0,40 e 0,37, respectivamente). Entretanto todas as concentrações das raízes foram capazes de afetar a emergência final (0,63, 58 e 53 nas concentrações de 10, 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>), o que não ocorreu para as folhas que apresentaram atividade inibitória para as maiores concentrações (61,3 e 69,2 para as concentrações de 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>) como demonstrado na tabela 19.

As cascas de *M. foetidus* não atrasaram a germinação e % final de germinação de *I. cordifolia*. A menor concentração das folhas (10 mg.g<sup>-1</sup>) também não foi suficiente para atrasar e conseqüentemente inibir a emergência da espécie-alvo testada. Todas as concentrações dos frutos e sementes inibiram a germinação de *I. cordifolia*, sendo este efeito superior às demais partes morfológicas. A concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> das sementes provocou inibição de 51,1% (tabela 20).

TABELA 19. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE EMERGÊNCIA (%E) DE *I. cordifolia* EM LABORATÓRIO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE)		
N = 4 REPETIÇÕES	RAÍZES	FOLHAS
CONTROLE	0,56±0,17	67,9±1,21
10 mg.g <sup>-1</sup>	0,42±0,33	0,51±1,14*
25 mg.g <sup>-1</sup>	0,40±0,29*	0,48±1,17*
50 mg.g <sup>-1</sup>	0,37±1,76*	0,41±1,23*
% DE EMERGÊNCIA (%E)		
N = 8 REPETIÇÕES	RAÍZES	FOLHAS
CONTROLE	67,9±3,4	67,9±3,4
10 mg.g <sup>-1</sup>	63,4±2,19*	66,7±1,17 <sup>ns</sup>
25 mg.g <sup>-1</sup>	58,7±1,21*	61,3±1,76*
50 mg.g <sup>-1</sup>	53,4±2,31*	59,2±1,26*

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

TABELA 20. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE EMERGÊNCIA (%E) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE)				
	CONTROLE	10 mg.g <sup>-1</sup>	25 mg.g <sup>-1</sup>	50mg.g <sup>-1</sup>
FOLHAS	0,56±0,33	0,54±0,77 <sup>ns</sup>	0,50±0,56*	0,49±0,16*
CASCAS	0,56±0,33	0,57±0,89 <sup>ns</sup>	0,56±0,89 <sup>ns</sup>	0,56±0,45 <sup>ns</sup>
FRUTOS	0,56±0,33	0,48±0,17*	0,43±0,18*	0,37±0,78*
SEMENTES	0,56±0,33	0,49±0,22*	0,43±0,89*	0,41±0,23*
% DE EMERGÊNCIA (%E)				
	CONTROLE	10 mg.g <sup>-1</sup>	25 mg.g <sup>-1</sup>	50mg.g <sup>-1</sup>
FOLHAS	67,9±3,17	64,5±2,33*	61,2±2,18*	58,4±1,28*
CASCAS	67,9±3,17	67,3±3,17 <sup>ns</sup>	66,8±1,66 <sup>ns</sup>	66,1±1,22 <sup>ns</sup>
FRUTOS	67,9±3,17	63,4±1,29*	58,3±1,29*	51,2±3,27*
SEMENTES	67,9±3,17	63,3±2,27*	61,2±1,27*	51,1±2,19*

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

Efeitos inibitórios também foram observados para a raiz primária. Todas as concentrações das folhas e raízes de *A. extraaxillaris* demonstraram potencial inibitório no crescimento das raízes, mas apenas a concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> das

raízes foram capazes de inibir o crescimento em 50% (figura 45 A). No crescimento do hipocótilo, o mesmo efeito foi verificado, com efeito inibitório superior observado para as raízes na concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> (figura 45 B).

As diferentes concentrações das folhas, frutos e sementes também inibiram o crescimento da raiz primária e hipocótilo de *I. cordifolia*. Efeito inibitório para os lixiviados das cascas não foram verificados. Os frutos inibiram o crescimento da raiz e hipocótilo em 57% e 55% na concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup>. Efeito similar foi observado para lixiviados das sementes com 48% e 45% de inibição da raiz e hipocótilo na concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> (figura 45 C e D).

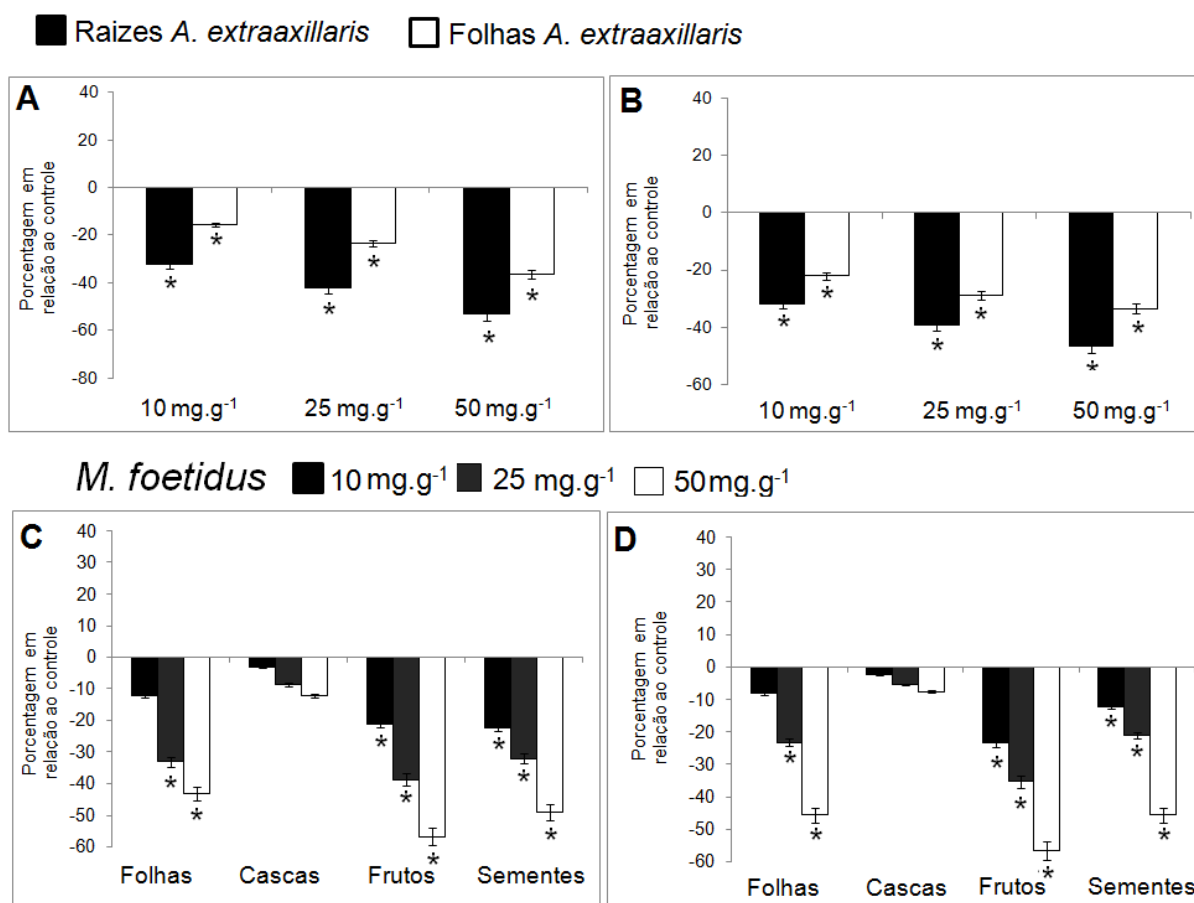


FIGURA 45. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* E FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE O CRESCIMENTO DA RAIZ E PARTE AÉREA DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05).

As diferentes partes morfológicas que apresentaram atividade alelopática demonstraram maior efeito de inibição no crescimento das raízes. Macias e Colaboradores (2000), relatam que os sistemas vivos apresentam uma grande variabilidade na sua resposta aos tratamentos, e um único agente pode induzir efeitos em diferentes espécies para maior confiabilidade dos resultados e observação de algum efeito seletivo. As diferentes partes morfológicas aqui investigadas com potencial alelopático demonstram que são efetivos no controle de *I. cordifolia*, e que esse efeito pode ocorrer pela lixiviação de substâncias presentes em *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* no crescimento de *I. cordifolia*.

Os efeitos inibitórios foram proporcionais à quantidade de material utilizado, demonstrando que existe uma relação dose-dependente, com aumento de atividade proporcional ao aumento da concentração. Nos estudos alelopáticos, geralmente a bioatividade tende a exibir um padrão dose- resposta, ou seja, a inibição observada é dependente da concentração de aleloquímicos disponíveis, com isso os compostos tendem a agir como inibidores em concentrações mais elevadas e essa atividade tende a diminuir com a diluição (MACIAS *et al.*, 2000), como observado por CHON e Colaboradores (2000).

Em estudos sobre a atividade alelopática de espécies de plantas pelo método de lixiviados, foi verificado que *A. fauriei* estimulou o crescimento de alface (FUJII *et al.* 2003). No mesmo trabalho, os autores verificaram efeito inibitório de espécies de várias famílias como, por exemplo, Amaryllidaceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Guttiferae, Icacinaceae, Leeaceae, Leguminosae, Meliaceae, entre outras, observando a inibição superior a 50%.

Rolim de Almeida e Colaboradores (2008) avaliaram a atividade alelopática das folhas de *Leonurus sibiricus* sobre a germinação e crescimento inicial de *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa* e *Lepidium sativum*, e verificaram a inibição da germinação de alface quando submetida ao extrato metanólico das folhas de *L. sibiricus*. As análises fitoquímicas mostraram a presença de quatro grandes flavonóides nas folhas de *L. sibiricus*; entre os quais a quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1,6)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo; e de três compostos flavônicos menores, entre eles a quercetina. Os flavonóides isolados apresentaram atividade alelopática na germinação e crescimento, variando com a concentração das substâncias.

Os ácidos fenólicos e os flavonóides estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais e freqüentemente são associados a fenômenos alelopáticos. A maior parte dos estudos realizados tem tido como objetivo estabelecer os mecanismos de ação dessas duas classes de compostos. Os ácidos fenólicos são mencionados como responsáveis pela redução de absorção de micro e macronutrientes em diversas espécies. O ácido ferúlico pode atuar na inibição da absorção de fosfato, enquanto que o ácido clorogênico pode alterar o balanço de nutrientes nas plantas. Os flavonóides naringenina, genisteína e canferol também interferem de maneira indireta na absorção de nutrientes pelas plantas (SANTOS; REZENDE, 2008).

Os compostos fenólicos reduzem a atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes. A toxicidade de muitos fenóis pode, em grande parte, ser atribuída à formação de semiquinona. A produção de formas reativas de oxigênio (FROs) pode afetar a permeabilidade da membrana e causar danos ao DNA e proteínas (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

#### 5.9.10 EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Na avaliação do estresse oxidativo pelo método de lixiviados foi observado aumento na produção de catalase em todas as concentrações ensaiadas com lixiviados das folhas e raízes de *A. extraaxillaris*, com aumento acentuado para a concentração de 50 mg (3,2 e 2,5  $\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  para raízes e folhas) (figura 46 A). As cascas de *M. foetidus* não afetaram a produção da catalase em *I. cordifolia* e apenas as maiores concentrações aumentaram a produção em folhas, frutos e sementes, com considerável aumento de 4,6  $\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  na concentração de 50  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dos frutos (figura 47 A). Resultados semelhantes foram obtidos para a

peroxidase em *A. extraaxillaris* (figura 46 B). Entretanto, a concentração de 10 mg.g<sup>-1</sup> não aumentou a produção dessa enzima. Em *M. foetidus* apenas as maiores concentrações dos frutos e todas as concentrações das sementes aumentaram a atividade da peroxidase (figura 47 B). Na atividade da SOD, foi verificado que todas as concentrações das raízes de *A. extraaxillaris* (2,8 U.mg<sup>-1</sup>; 3,2 U.mg<sup>-1</sup> e 4,9 U.mg<sup>-1</sup> para as concentrações de 10, 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>) e a maior concentração das folhas aumentaram a produção de SOD (3.6 U.mg<sup>-1</sup>) (figura 46 C). De maneira semelhante à peroxidase, os lixiviados das folhas e cascas de *M. foetidus* não aumentaram a produção de SOD, sendo valores significativos obtidos para os frutos e sementes. A maior atividade da SOD foi verificada para a concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> das sementes (42,4 U.mg<sup>-1</sup>), como demonstrado na figura 47 C.

Na atividade da glutathiona reduzida (GSH), raízes tiveram efeito mais acentuado, com aumento de 3,7 µmol.NADH.min<sup>-1</sup> na concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup>. Apenas a menor concentração das folhas não estimulou a produção da GSH (figura 46 D). A atividade da GSH em plantas de *I. cordifolia* tratadas com os lixiviados de *M. foetidus* demonstrou que apenas a maior concentração das sementes estimulou a produção de GSH, e que todas as concentrações dos frutos aumentaram a atividade com valores de até 4,3 µmol.NADH.min<sup>-1</sup> na concentração de 50 mg.g<sup>-1</sup> (figura 47 D). A peroxidação lipídica aumentou em função da concentração utilizada para lixiviados de raízes, não sendo tal efeito verificado para a menor concentração das folhas. Aumento na produção de malondialdeído foi verificado em 40% e 46% para as concentrações de 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>, sendo verificados menores valores de inibição para as concentrações de 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup> com 27,2% e 35,6%, respectivamente (figura 46 E).

Somente os lixiviados das folhas de *M. foetidus* aumentaram a produção de malondialdeído em plantas de *I. cordifolia* (figura 47 E), indicando que a baixa taxa de peroxidação lipídica em *I. cordifolia* após 30 dias pode estar relacionada à produção da GSH. Dudler e Colaboradores (1991); BARLING e Colaboradores (1993) relatam que alguns produtos endógenos provenientes de herbicidas, que são causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, são inibidos pela ação da GSH, visando sua desintoxicação. O elevado nível de peróxido de



hidrogênio induz um grande aumento na produção de GSH por atuarem diretamente sob tais produtos.

O aumento na síntese de formazan também foi observado para as concentrações de *A. extraaxillaris*, com síntese acentuada para a concentração de 10 mg.g<sup>-1</sup> (0,362 nm para folhas e raízes) (figura 46 F). Nos lixiviados de *M. foetidus*, observa-se que todas as concentrações dos frutos (0,260; 0,223 3 0,181- concentrações de 10, 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>) e maiores concentrações das sementes reduziram a síntese de formazan em plantas de *I. cordifolia* (0,311 nas concentrações de 25 e 50 mg.g<sup>-1</sup>), não sendo verificado interferência pelos lixiviados das folhas e cascas (figura 47 F).

As substâncias alelopáticas afetam mais de uma função no organismo atingido, dentre eles pode-se mencionar redução na absorção de nutrientes, alteração nos hormônios de crescimento, inibição da fotossíntese, alterações no processo respiratório acelerando ou diminuindo a respiração, efeitos na síntese de proteínas, alterações na permeabilidade da membrana e inibição da atividade enzimática (MONTEIRO; VIEIRA, 2002).

No campo, os efeitos alelopáticos negativos sobre a germinação levam à desuniformidade da cultura, uma vez que os aleloquímicos podem proporcionar estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que atua de forma direta ou como sinalizador nos processos de degradação celular causando danos em processos fisiológicos e alterando o desenvolvimento inicial das plântulas (ALMEIDA *et al.*, 2008).

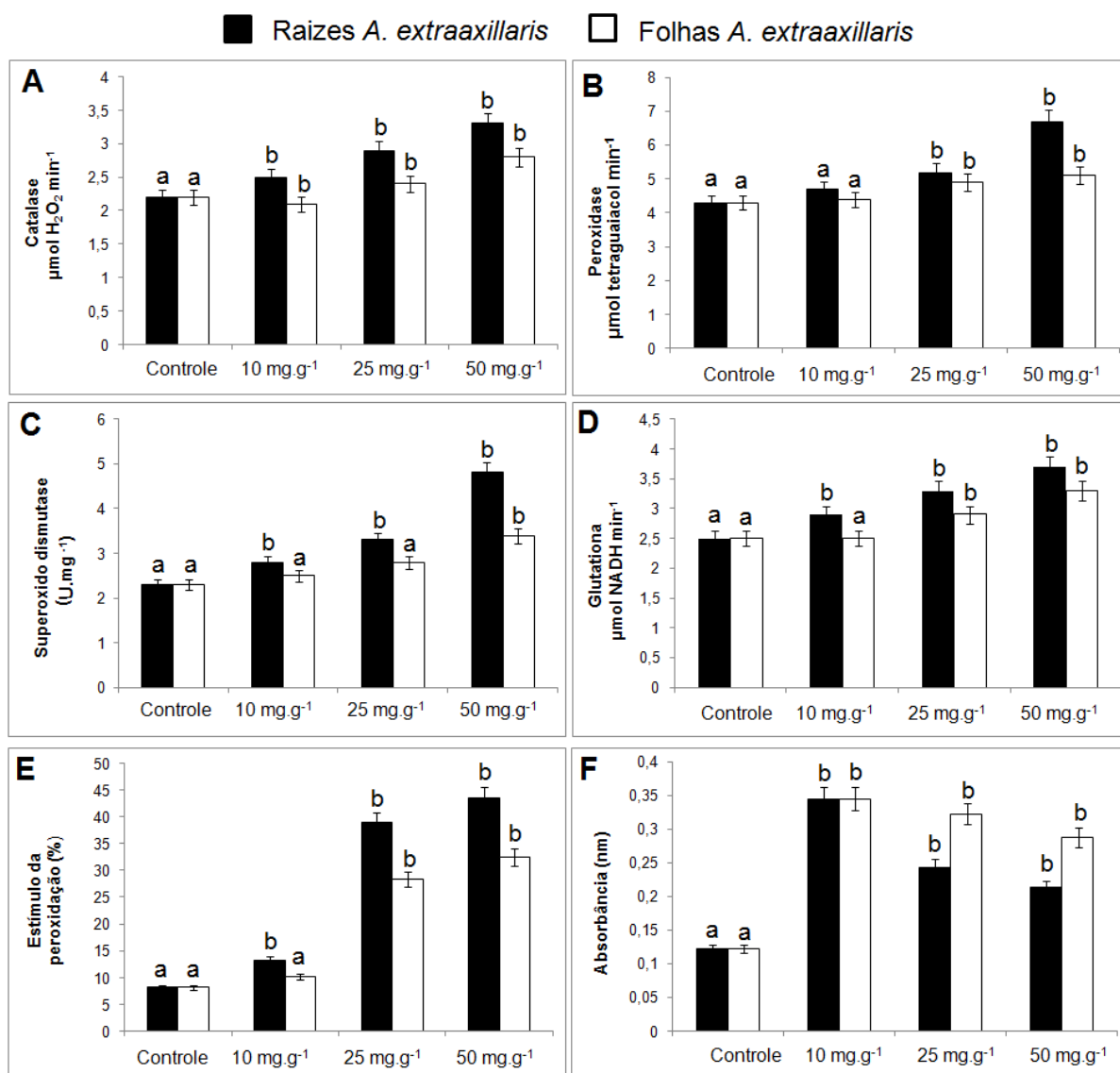


FIGURA 46. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS RAÍZES E FOLHAS DE *A. extraaxillaris* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE(C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

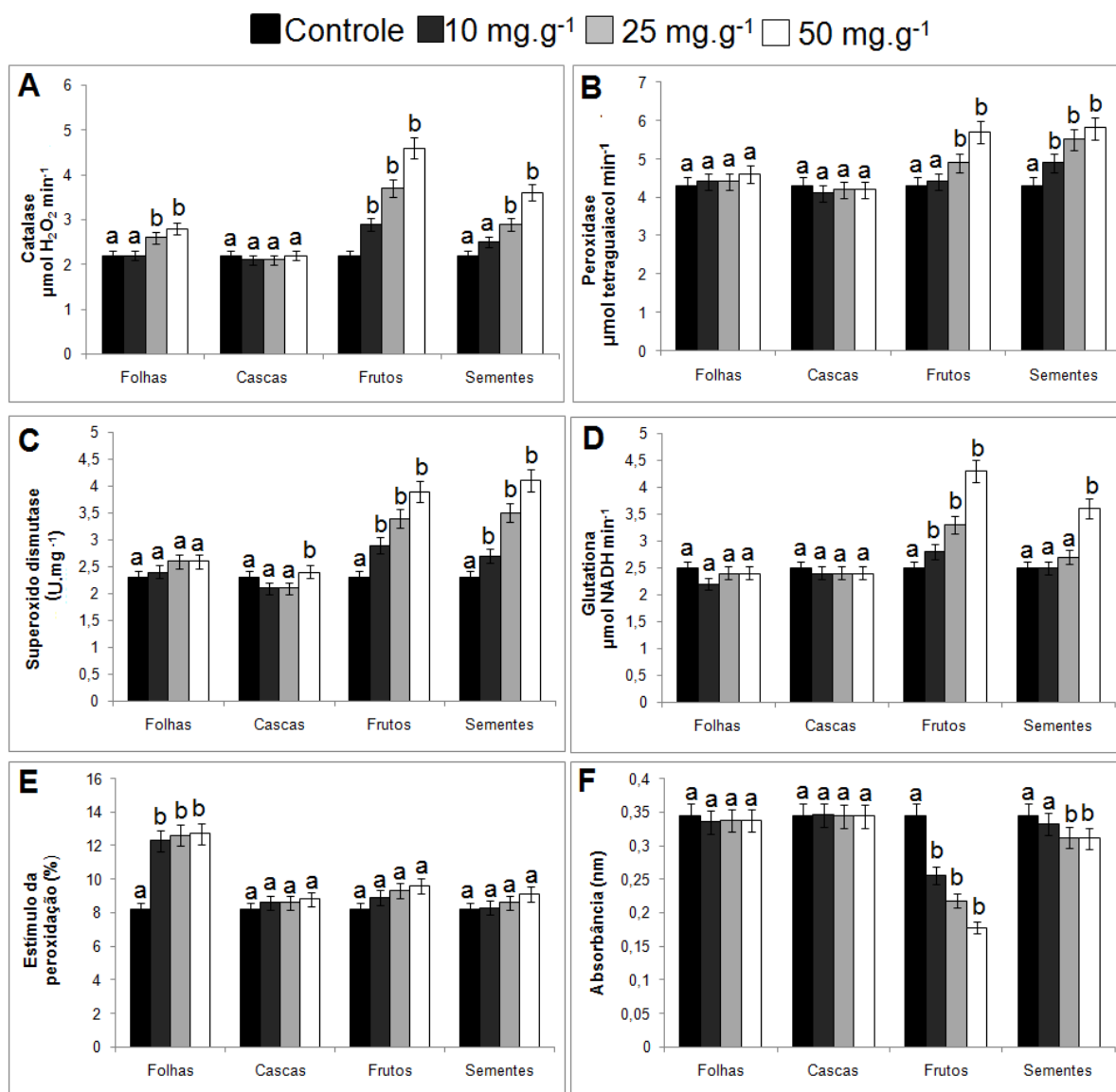


FIGURA 47. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E SEMENTES DE *M. foetidus* SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE (A) PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (E) E SÍNTESE DE FORMAZAN (F) DE *I. cordifolia* EM CASA DE VEGETAÇÃO PELO MÉTODO DE LIXIVIADOS.\*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Semelhante a alguns herbicidas comerciais, aleloquímicos com potencial herbicida são capazes de promover estresse oxidativo em plantas, aumentando a atividade de enzimas como a peroxidase, catalase e superóxido dismutase (YU *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2005). Algumas alterações bioquímicas são atribuídas aos aleloquímicos presentes no extrato de *Cucumis sativus*, como peroxidação de membrana, aumento das enzimas antioxidantes e alterações nas trocas gasosas (YU *et al.*, 2003)

É importante ressaltar que o potencial alelopático da cobertura vegetal depende da quantidade de resíduo vegetal utilizado, do tipo de substância que é liberada no solo e do tipo de plantas daninhas que ali se desenvolvem, o que torna a escolha do material vegetal a ser utilizado de extrema importância, uma vez que, em quantidades similares, há respostas distintas entre as coberturas para uma mesma espécie de planta daninha (TOKURA; NÓBREGA, 2006; MORAES *et al.*, 2010).

Com isso, é possível perceber que os procedimentos experimentais de alelopatia geram contribuições para os estudos de dinâmica entre espécies vegetais e para a elaboração de estratégias alternativas de produção e manejo de culturas (SOUZA-FILHO *et al.*, 2010), através da escolha de espécies que reduzam os custos de produção, da diminuição do uso de defensivos químicos, amenizando os impactos que os mesmos causam no ecossistema (GOLDFARB *et al.*, 2009), e para a prática de uma agricultura sustentável.

#### 5.9.11 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES EM LABORATÓRIO

A atividade alelopática dos extratos etanólico bruto e frações foram avaliados a fim de comparar a atividade a partir dos resultados obtidos pelo método de difusão em ágar. Conforme observado para o método de difusão em Ágar, os efeitos variaram em função do extrato e partes morfológicas. Para a espécie *A. extraaxillaris*, foi verificado que o EEB e FS também atrasaram a germinação de sementes de *C. argenteus*. Apenas a menor concentração ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da fração

remanescente (FR) não causou atraso na germinação. Os demais extratos e frações provocaram alterações no padrão de germinação quando comparados ao controle. Os maiores efeitos foram observados para as FH (fração hexânica) e FAE (fração acetato de etila) na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (8,50 e 8,32, respectivamente) como apresentado na tabela 21. A porcentagem final de germinação também foi afetada pelas concentrações dos extratos e frações (tabela 19 e figura 48, com efeitos mais acentuados para a FH e FAE (58% e 56%) na maior concentração, como observação para o IVG.

TABELA 21. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (% G) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<b>Controle: 16,97 <math>\pm</math> (0,59)</b>			
EEB	14,57 $\pm$ 0,33*	12,47 $\pm$ 0,35)*	10,00 $\pm$ 0,65*
FH	12,52 $\pm$ 0,33*	10,27 $\pm$ 0,28*	8,50 $\pm$ 0,25*
FCL	15,47 $\pm$ 0,33*	14,82 $\pm$ 0,09*	14,00 $\pm$ 0,18*
FAE	13,62 $\pm$ 0,25*	10,62 $\pm$ 0,35*	8,32 $\pm$ 0,33*
FR	16,12 $\pm$ 0,26 <sup>ns</sup>	14,40 $\pm$ 0,35*	12,55 $\pm$ 0,34*
Porcentagem de Germinação (%G)			
Tratamento	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<b>Controle: 96,97 <math>\pm</math> (0,59)</b>			
EEB	83,50 $\pm$ 1,91*	79,50 $\pm$ 1,00*	74,50 $\pm$ 2,51*
FH	83,50 $\pm$ 0,50*	79,00 $\pm$ 1,55*	75,50 $\pm$ 0,50*
FCL	90,50 $\pm$ 1,00*	85,50 $\pm$ 1,55*	83,00 $\pm$ 1,15*
FAE	86,00 $\pm$ 1,63*	78,00 $\pm$ 1,63*	71,50 $\pm$ 1,91*
FR	88,50 $\pm$ 1,00*	80,50 $\pm$ 1,91*	72,25 $\pm$ 2,06*

<sup>1</sup>MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $P < 0,05$ ) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

A atividade inibitória também foi observada para os extratos e concentrações de *M. foetidus*. A FH e FAE das folhas (6,55 e 9,45) e frutos (8,50 e 8,32) para a concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 22) apresentaram atraso acentuado na germinação. Não foi verificado efeito na velocidade de germinação em sementes tratadas com os extratos e frações das cascas (tabelas 23). Os frutos de *M. foetidus* afetaram de maneira mais intensa a porcentagem final de germinação. Os efeitos mais pronunciados foram observados para a FH e FR na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (76% e 71% respectivamente) (tabela 24).

TABELA 22. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DA FOLHAS DE *M. foetidus* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	Folhas		
	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Controle: 16,35 $\pm$ 0,26			
EEB <sup>1</sup>	14,55 $\pm$ 0,19*	13,37 $\pm$ 0,35*	11,42 $\pm$ 0,35*
FH <sup>1</sup>	11,50 $\pm$ 0,25*	8,45 $\pm$ 0,26*	6,55 $\pm$ 0,31*
FCL <sup>1</sup>	16,70 $\pm$ 0,39	15,42 $\pm$ 0,35*	14,40 $\pm$ 0,35*
FAE <sup>1</sup>	12,40 $\pm$ 0,35*	11,40 $\pm$ 0,31*	9,45 $\pm$ 0,26*
FR <sup>1</sup>	15,42 $\pm$ 0,36*	14,17 $\pm$ 0,15 <sup>ns</sup>	14,10 $\pm$ 0,08 <sup>ns</sup>
Porcentagem de Germinação (% G)			
Tratamento	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Controle: 93,00 $\pm$ 0,26			
EEB <sup>1</sup>	87,50 $\pm$ 1,91	80,00 $\pm$ 2,82*	75,50 $\pm$ 1,00*
FH <sup>1</sup>	82,00 $\pm$ 1,63*	78,00 $\pm$ 1,60*	72,00 $\pm$ 1,00*
FCL <sup>1</sup>	92,00 $\pm$ 5,16 <sup>ns</sup>	82,50 $\pm$ 3,00*	79,00 $\pm$ 1,15*
FAE <sup>1</sup>	81,50 $\pm$ 1,91*	77,00 $\pm$ 3,46*	73,00 $\pm$ 1,15*
FR <sup>1</sup>	94,00 $\pm$ 1,12 <sup>ns</sup>	92,00 $\pm$ 1,55 <sup>ns</sup>	91,50 $\pm$ 1,09 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup>MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup> A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

TABELA 23. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DA CASCAS DE *M. FOETIDUS* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO.

Cascas			
Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	250 µg.mL <sup>-1</sup>	500 µg.mL <sup>-1</sup>	1.000 µg.mL <sup>-1</sup>
Controle: 16,97 ± 0,59			
EEB <sup>1</sup>	16,72±1,11 <sup>ns</sup>	16,21 ±1,67 <sup>ns</sup>	16,78 ±2,45 <sup>ns</sup>
FH <sup>1</sup>	16,70±1,23 <sup>ns</sup>	16,43±1,63 <sup>ns</sup>	16,28±1,84 <sup>ns</sup>
FCL <sup>1</sup>	16,43±1,66 <sup>ns</sup>	16,87±1,39 <sup>ns</sup>	16,35±1,96 <sup>ns</sup>
FAE <sup>1</sup>	16,86±1,20 <sup>ns</sup>	16,37±1,43 <sup>ns</sup>	16,17±1,39 <sup>ns</sup>
FR <sup>1</sup>	16,76±1,42 <sup>ns</sup>	16,73±1,84 <sup>ns</sup>	16,39±1,24 <sup>ns</sup>
Porcentagem de Germinação (% G)			
Tratamento	250 µg.mL <sup>-1</sup>	500 µg.mL <sup>-1</sup>	1.000 µg.mL <sup>-1</sup>
Controle: 96,00 ± 2,58			
EB <sup>1</sup>	96,00 ± 1,22 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,12 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,00 <sup>ns</sup>
FH <sup>1</sup>	94,00 ± 1,55 <sup>ns</sup>	94,00 ± 1,00 <sup>ns</sup>	94,00 ± 1,00 <sup>ns</sup>
FCL <sup>1</sup>	96,00 ± 1,34 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,35 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,50 <sup>ns</sup>
FAE <sup>1</sup>	96,00 ± 1,23 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,17 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,50 <sup>ns</sup>
FR <sup>1</sup>	96,00 ± 1,76 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,88 <sup>ns</sup>	96,00 ± 1,17 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

TABELA 24. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DOS FRUTOS DE *M. foetidus* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO.

Frutos			
Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	250 µg.mL <sup>-1</sup>	500 µg.mL <sup>-1</sup>	1.000 µg.mL <sup>-1</sup>
Controle: 16,35 ± 0,26			
EEB <sup>1</sup>	10,22± 0,33*	12,47 ± 0,35*	10,00 ± 0,65*
FH <sup>1</sup>	12,52± 0,33 <sup>ns</sup>	10,27 ± 0,28*	8,50 ± 0,25*
FCL <sup>1</sup>	15,47 ± 0,33*	14,82± 0,09*	14,00± 0,18*
FAE <sup>1</sup>	13,62 ± 0,25*	10,62± 0,35*	8,32± 0,33*
FR <sup>1</sup>	16,12± 0,26 <sup>ns</sup>	14,40± 0,35*	12,55± 0,34*
Porcentagem de Germinação (% G)			
Tratamento	250 µg.mL <sup>-1</sup>	500 µg.mL <sup>-1</sup>	1.000 µg.mL <sup>-1</sup>
Controle: 98,75± 3,50			
EB <sup>1</sup>	84,00 ± 1,63*	79,00 ± 2,58*	78,00 ± 2,58*
FH <sup>1</sup>	83,00 ± 2,58*	84,50 ± 2,51*	76,00 ± 4,89*
FCL <sup>1</sup>	86,50 ± 2,51*	85,00 ± 2,58*	80,50 ± 3,41*
FAE <sup>1</sup>	84,00 ± 6,32 *	80,00 ± 3,65*	71,00 ± 1,63*
FR <sup>1</sup>	88,00 ± 1,63*	86,00± 2,82*	84,50± 4,12*

<sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

Diferenças nas respostas alelopáticas de extratos de diferentes órgãos de uma mesma planta também foram registradas por Juan Jimenez-Ozornio e Colaboradores (1996); Delachiave e Colaboradores (1999); Wu e Colaboradores (2000). Friedmam (1995) afirma que a quantidade de aleloquímicos e sua liberação pelos órgãos da planta são variações que ocorrem de espécie para espécie.

A atividade alelopática de espécies do gênero Fabaceae tem sido evidenciados na literatura. Mariz (1953), identificou a presença de cumarina no caule da *Amburana cearensis*, sendo a ação inibitória na germinação de plantas atribuída a esta substância. Substâncias presentes nas sementes também são destacadas por possuir propriedades inseticidas (TIGRE, 1968). Scherer e Colaboradores (2005), constataram a atividade alelopática de leucena sobre espécies arbóreas como a canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng), mostrando que a leucena pode interferir em algumas espécies influenciando na sua germinação ou desenvolvimento.

Os efeitos alelopáticos também podem ser observados no crescimento da raiz primária e hipocótilo para os extratos de ambas as espécies. Em *A. extraaxillaris*, foi verificado que os extratos e frações inibiram o crescimento da raiz primária e hipocótilo de *C. argenteus*. Um efeito inibitório de 50% foi observado na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , na FH e FAE. A concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do EEB e FCL não inibiram o crescimento da raiz primária (figura 48 A). Efeitos no crescimento da raiz primária e hipocótilo também foram observados nos extratos e FS nas diferentes partes morfológicas de *M. foetidus*. Nas folhas, foi verificado que o EEB, FCL e FAE inibiram o crescimento da raiz primária, com maior atividade verificada para o EEB na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (44,3%) (figura 49 A). Para o extrato e frações das cascas, o EEB, FH e maior concentração da FAE também provocaram inibição da raiz primária, sendo esse efeito igual a 50,3% de inibição para a concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da FH (figura 50 A). A FH dos frutos de *M. foetidus* não afetou o crescimento da raiz primária de *C. argenteus*. Entretanto as demais frações inibiram o crescimento da raiz, com 57,6% e 71,7% de inibição na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o EEB e FAE (figura 51 A).

No crescimento do hipocótilo, efeitos menos acentuados foram observados, quando comparados ao crescimento das raízes. Em *A. extraaxillaris*, apenas a maior concentração afetou o crescimento do hipocótilo para a FR. A FAE provocou efeito inibitório mais acentuado, sendo observado inibição de 23% para a concentração de



1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 48 B). Apenas as maiores concentrações do EEB e FAE afetaram o crescimento do hipocótilo, com efeito mais acentuado para a maior concentração da FAE (43,7%) (figura 49 B). Diferente do que foi observado para a raiz primária, o EEB e frações das cascas afetaram o crescimento do hipocótilo de *C. argenteus* (figura 50 B). Maiores valores de inibição foram observados para ao EEB (37,2%) e FCL (26,5%). A FH e menor concentração do EEB e FR dos frutos não afetaram o crescimento do hipocótilo. A maior concentração da FCL e FAE promoveram inibição no crescimento de 47% e 63%, respectivamente (figura 51 B).

■ 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ■ 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  □ 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

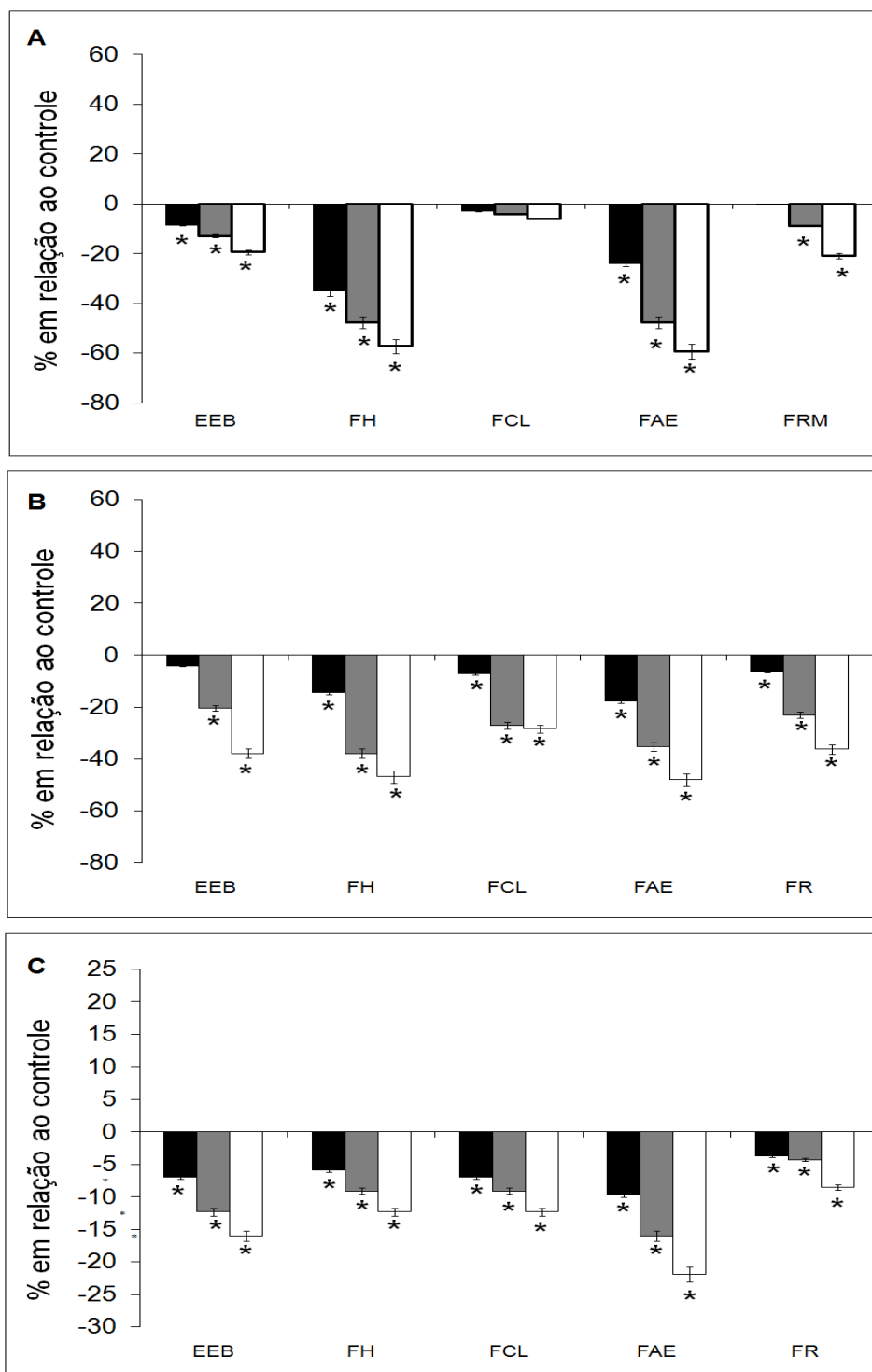


FIGURA 48. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DE *A. extraaxillaris* NO CRESCIMENTO DA RAIZ PRIMÁRIA (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

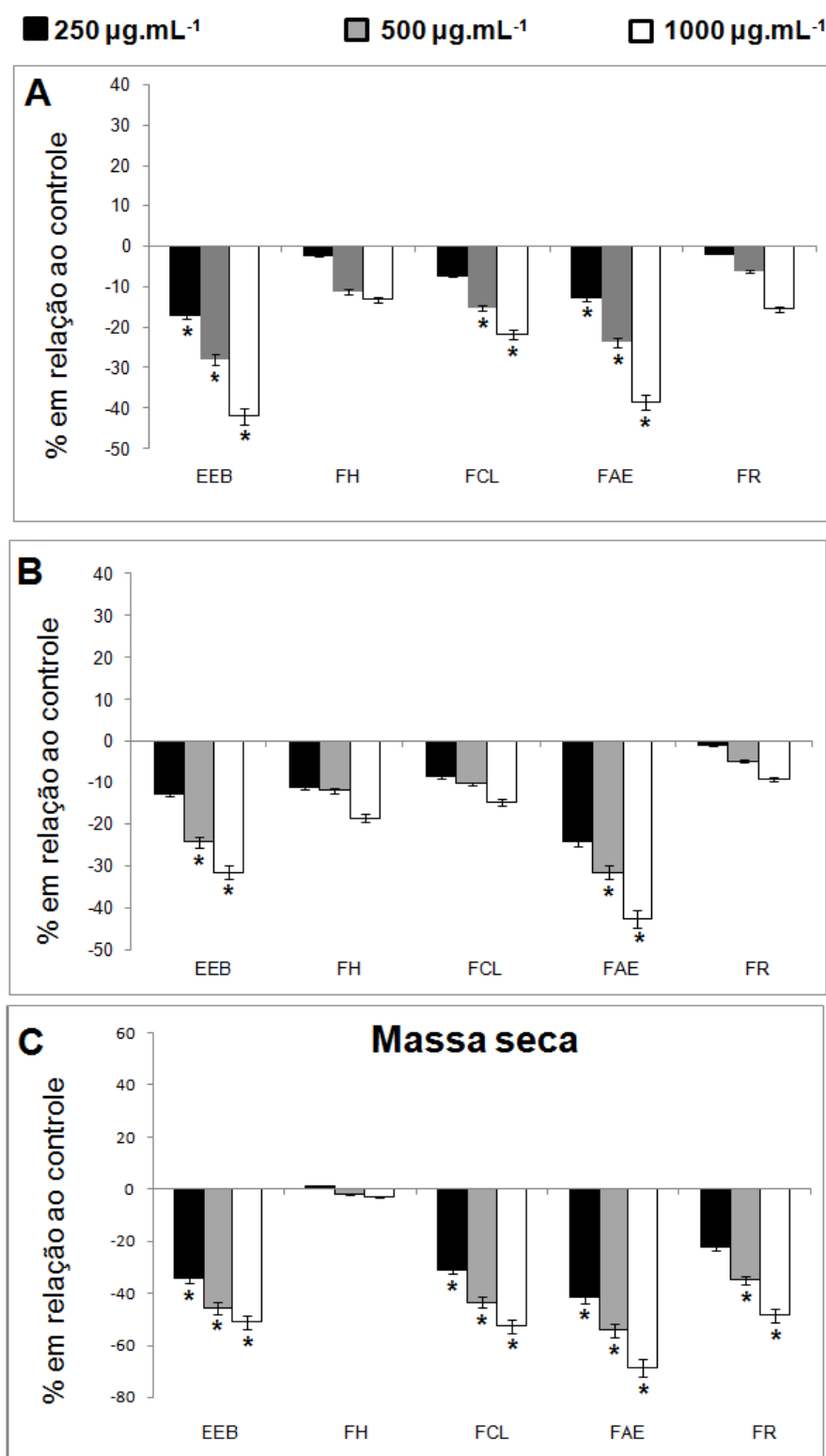


FIGURA 49. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ, HIPOCÓTILO E MASSA SECA DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

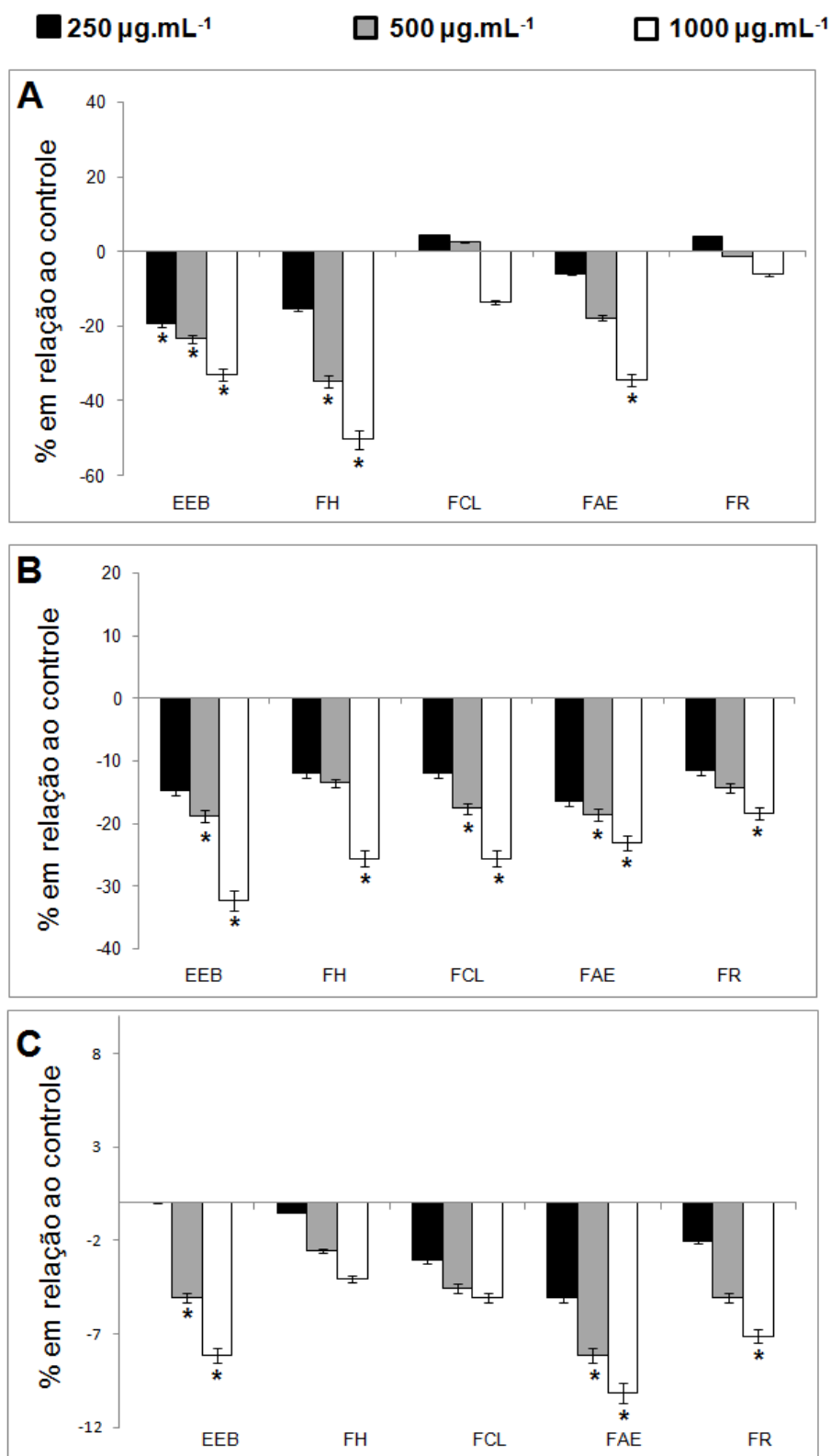


FIGURA 50. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DAS CASCAS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ, HIPOCÓTILO E MASSA SECA DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

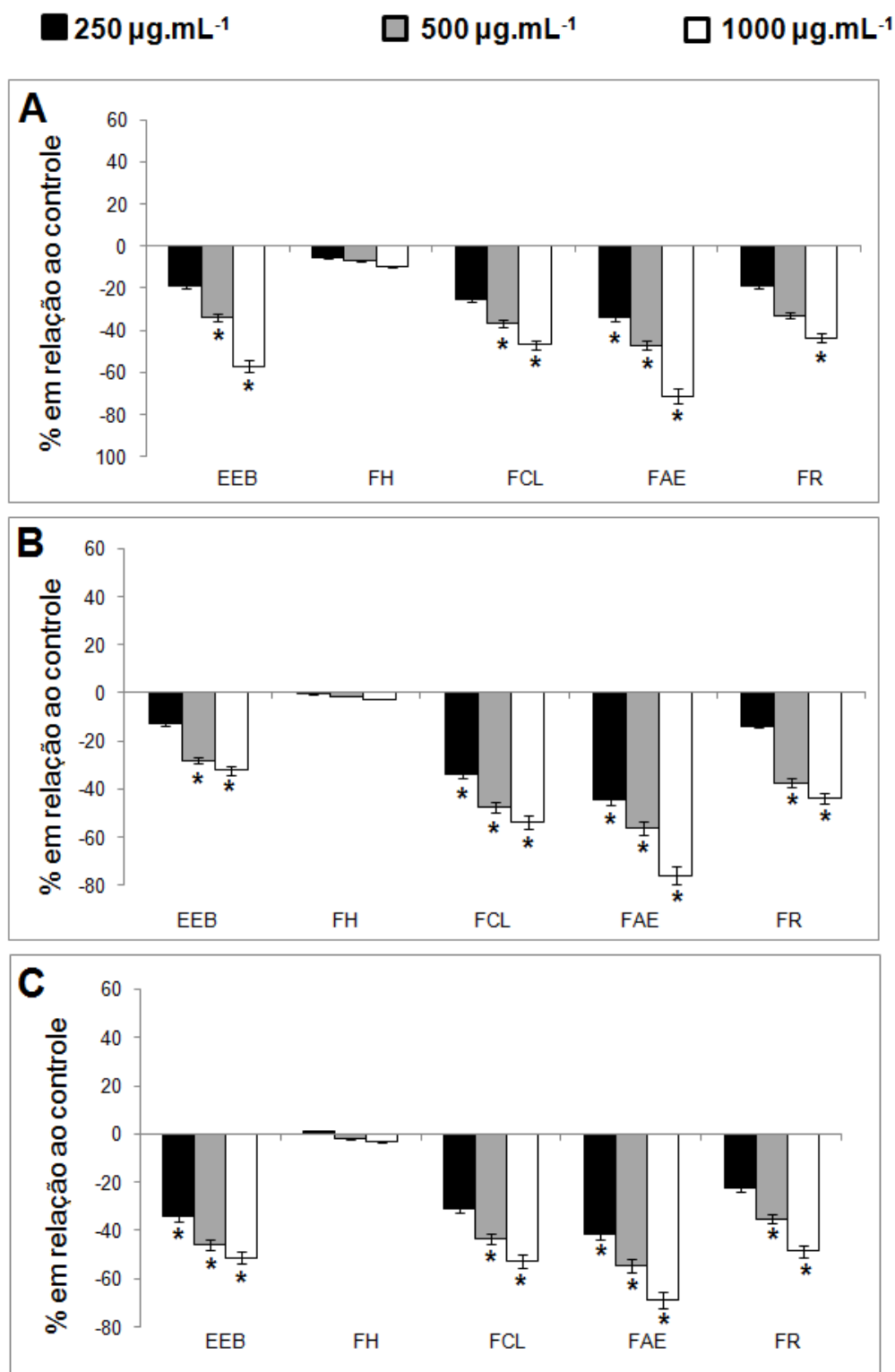


FIGURA 51. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAIZ (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Os efeitos observados na redução da massa seca podem ser atribuídos à inibição da raiz primária e hipocótilo. Foi verificado que as maiores concentrações do EEB e FH e demais concentrações da FCL, FAE e FR de *A. extraaxillaris* inibiram a massa seca em plântulas de *C. argenteus* (figura 48 C). Em *M. foetidus*, foi observada redução na massa seca para todas as partes morfológicas testadas. A FH das folhas (figura 49 C), FH e FCL das cascas (figura 50 C) e FH dos frutos (figura 51 C) não alteraram o conteúdo de massa seca final nas plântulas testadas. Inibição acentuada foi observada para a maior concentração na FAE das folhas (68,7%), cascas (10,3%) e frutos (66,4%).

Gatti e Colaboradores (2004) citaram que estas variações podem ser explicadas devido a um investimento diferenciado de carbono, ou na raiz ou na parte aérea, influenciado diretamente pelo tipo e concentração do extrato. Durante o crescimento inicial, foi observado o engrossamento, ausência de pêlos absorventes e oxidação do ápice da raiz (figura 52).

O experimento em casa de vegetação foi conduzido para avaliar o efeito fitotóxico dos extratos e frações de duas espécies com potencial alelopático verificado em casa de vegetação: *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*.

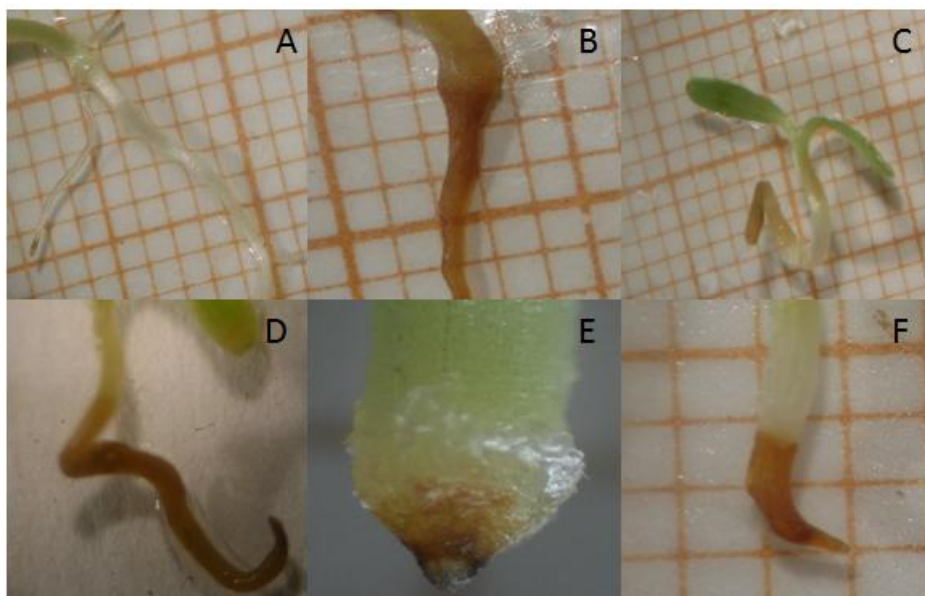


FIGURA 52. EFEITOS OBSERVADOS EM PLÂNTULAS DE *C. argenteus* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris* E *M. foetidus*. A- CONTROLE, B- FH *A. extraaxillaris*; C- FAE *A. extraaxillaris*; D- FAE FRUTOS *M. foetidus*; E- FCL FRUTOS *M. foetidus*; F- FAE FOLHAS *M. foetidus*.

### 5.9.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EEB E FRAÇÕES EM CASA DE VEGETAÇÃO

No índice de velocidade de emergência (IVE), foi verificado que os extratos e frações de *A. extraaxillaris* atrasaram a emergência de *C. argenteus* em todos os extratos e frações testados, nas diferentes concentrações (Tabela 25). Efeito acentuado na inibição foi verificado para a FH e FAE, apresentando atraso de 0,30 e 0,21 para a concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Similar ao observado em *A. extraaxillaris*, o EEB e FAE de *M. foetidus* também alterou a velocidade de emergência em *C. argenteus* (tabela 25). O EEB e FAE das folhas atrasaram a emergência, sendo observado maior atraso para a FAE dos frutos na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (62,77) (tabela 25).

TABELA 25. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS EMERSAS DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Índice de velocidade de emergência (IVE)				
n = 8 repetições	Controle	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Extrato etanólico bruto	0,48 $\pm$ 0,13	0,41 $\pm$ 0,17*	0,37 $\pm$ 0,14*	0,33 $\pm$ 0,11*
Fração hexânica	0,48 $\pm$ 0,13	0,35 $\pm$ 0,19*	0,31 $\pm$ 0,17*	0,30 $\pm$ 0,16*
Fração acetato de etila	0,48 $\pm$ 0,13	0,28 $\pm$ 0,13*	0,23 $\pm$ 0,08*	0,21 $\pm$ 0,13*
Fração Clorofórmio	0,48 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,11*	0,33 $\pm$ 0,08*	0,32 $\pm$ 0,14*
Fração remanescente	0,48 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,11*	0,35 $\pm$ 0,06*	0,33 $\pm$ 0,06*
% de plântulas Emersas (%E)				
n = 8 repetições	Controle	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Extrato etanólico bruto	57,34 $\pm$ 2,51	55,34 $\pm$ 3,33*	52,34 $\pm$ 2,37*	50,89 $\pm$ 2,12*
Fração hexânica	57,34 $\pm$ 2,51	50,45 $\pm$ 2,38*	47,89 $\pm$ 1,98*	45,67 $\pm$ 3,78*
Fração acetato de etila	57,34 $\pm$ 2,51	48,56 $\pm$ 3,46*	43,89 $\pm$ 2,10*	40,76 $\pm$ 3,21*
Fração Clorofórmio	57,34 $\pm$ 2,51	53,28 $\pm$ 3,43*	50,28 $\pm$ 2,89*	48,67 $\pm$ 2,21*
Fração remanescente	57,34 $\pm$ 2,51	52,44 $\pm$ 2,12*	50,67 $\pm$ 3,21*	49,87 $\pm$ 2,76*

<sup>1</sup>MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

Os mesmos efeitos foram observados na porcentagem de plântulas emersas. Em *A. extraaxillaris* foi observado inibição na porcentagem final de plântulas emersas em todas as frações e EEB, com maior efeito observado para a FAE (40,76% concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Tabela 26). O extrato das folhas e frutos provocaram inibição da emergência, onde efeitos mais acentuados são observados para a concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da FAE para as folhas (41,12%) e frutos (38,5%), como observado na tabela 26. Efeito de dose- dependência foi observado nos extratos e frações que apresentaram atividade inibitória, sendo estes efeitos já observados em outros trabalhos em alelopatia (AIRES, 2007; PIRES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004; PERIOTTO *et al.*, 2003).

TABELA 26. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS E FRUTOS DE *M. foetidus* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA (IVE) E PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS EMERSAS DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Índice de velocidade de emergência (IVE)				
FOLHAS				
n = 8 repetições	Controle	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Extrato etanólico bruto	0,48 $\pm$ 0,13	0,44 $\pm$ 0,15 <sup>ns</sup>	0,41 $\pm$ 0,84*	0,38 $\pm$ 0,11*
Fração acetato de etila	0,48 $\pm$ 0,13	0,41 $\pm$ 0,23*	0,39 $\pm$ 0,47*	0,31 $\pm$ 0,18*
CASCAS				
Extrato etanólico bruto	0,48 $\pm$ 0,13	0,47 $\pm$ 0,13 <sup>ns</sup>	0,47 $\pm$ 0,14 <sup>ns</sup>	0,48 $\pm$ 0,16 <sup>ns</sup>
Fração acetato de etila	0,48 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,14 <sup>ns</sup>	0,46 $\pm$ 0,16 <sup>ns</sup>	0,46 $\pm$ 0,19 <sup>ns</sup>
FRUTOS				
Extrato etanólico bruto	0,48 $\pm$ 0,13	41,22 $\pm$ 0,11*	36,15 $\pm$ 0,15*	28,12 $\pm$ 0,13*
Fração acetato de etila	0,48 $\pm$ 0,13	38,77 $\pm$ 0,14*	33,12 $\pm$ 0,17*	27,15 $\pm$ 0,15*
% de plântulas Emersas (%E)				
FOLHAS				
n = 8 repetições	Controle	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Extrato etanólico bruto	60,27 $\pm$ 0,17	54,55 $\pm$ 3,43*	52,12 $\pm$ 2,89*	50,67 $\pm$ 2,21*
Fração acetato de etila	60,27 $\pm$ 0,17	50,12 $\pm$ 2,55*	46,62 $\pm$ 2,67*	41,12 $\pm$ 2,88*
FRUTOS				
Extrato etanólico bruto	60,27 $\pm$ 2,87	50,67 $\pm$ 2,78*	50,22 $\pm$ 3,67*	44,55 $\pm$ 3,31*
Fração acetato de etila	60,27 $\pm$ 2,87	48,22 $\pm$ 2,67*	44,26 $\pm$ 2,67*	38,50 $\pm$ 2,150*

<sup>1</sup>MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.



Em geral, foi verificado os maiores resultados fitotóxicos na emergência (IVE e %E) das plântulas-alvo quando as mesmas foram submetidas a FAE, sendo as maiores inibições verificadas para *A. extraaxillaris* e frutos de *M. foetidus*. Segundo Ranal e Santana (2006) a redução no IVE pode levar a redução progressiva na capacidade produtiva, com a redução na uniformidade do estabelecimento das plântulas.

A emergência reduzida pode conduzir a atrasos no desenvolvimento, desuniformidade da cultura em diversos estádios fenológicos (inclusive maturação), interferência na qualidade do produto e nas características da planta relacionadas a eficiência da colheita (MARCOS -FILHO, 2005). Portanto, a FAE de *A. extraaxillaris* e frutos de *M. foetidus* contêm substâncias químicas que agem nos processos fisiológicos das plântulas durante a emergência em *C. argenteus*, reduzindo o seu estabelecimento em casa de vegetação.

O controle na emergência de plantas é um fator importante em estudos de atividade alelopática, uma vez que na busca por recursos limitados no meio, há prêmio aparente para aqueles vegetais que exibem estabelecimento precoce. Plantas daninhas em crescimento devem apoderar-se rapidamente do espaço, representado pelos recursos, sendo seu sucesso competitivo dependente do uso antecipado desses. Cada planta para de crescer quando seu espaço é restringido pelas concorrentes, de tal forma que os últimos indivíduos a aparecer crescem muito pouco. Assim, os vegetais mais competitivos geralmente são os primeiros a emergir, indicando que a época de emergência torna-se mais importante do que o arranjo espacial de indivíduos na determinação do potencial competitivo dessa população de plantas (FISCHER; MILES, 1973).

Plantas que possuem emergência rápida e uniforme conseguem competir mais eficientemente pelos recursos do meio (DIARRA *et al.*, 1985; SHURTLEFF; COBLE, 1985; ROMAN *et al.*, 1999; NI *et al.*, 2000). Em sorgo, a velocidade de emergência se correlacionou positivamente com a capacidade das linhagens em competir com plantas daninhas (GUNEYLI *et al.*, 1969). Neste sentido, Fischer e Miles (1973), pesquisando os processos de interferência entre vegetais, formularam o princípio teórico em que, quanto maior for a velocidade de estabelecimento de uma planta, maior é o volume aéreo e edáfico ocupado e explorado pela mesma.

Existem três fatores-chave na predição das relações de interferência entre plantas daninhas e culturas: época de emergência, arranjo espacial e velocidade de crescimento das plantas (RADOSEVICH *et al.*, 1997). As primeiras plântulas a emergir, provavelmente, apresentarão maior produtividade, porque elas adquirem prioridade na utilização de água, luz e nutrientes; ou seja, ocupam precocemente o nicho (FIRBANK; WATKINSON, 1985). Nicho é o termo usado para descrever a posição ocupada por uma espécie dentro da comunidade (RADOSEVICH *et al.*, 1997). Dessa forma, o potencial alelopático da FAE das folhas e frutos de *M. foetidus* e FH e FAE de *A. extraaxillaris* tornam-se interessantes para posteriores estudos no controle de *C. argenteus*.

Analisando-se os resultados obtidos no crescimento das raízes das plantas cultivadas em casa de vegetação durante 30 dias, foi verificado que o EEB e frações de *A. extraaxillaris* inibiram o crescimento em todas as concentrações ensaiadas, sendo os maiores efeitos inibitórios observados para a FCL e FAE, com 42,7% e 58,5% de inibição na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 53 A). *M. foetidus* também apresentou efeito inibitório. O EEB e FAE das folhas inibiram o crescimento da raiz primária nas concentrações avaliadas, com valores de inibição superiores a 40% para a FAE (figura 54 A). Um maior efeito foi observado para o EEB e FAE dos frutos, onde valores superiores a 50% de inibição. A maior concentração da FAE na maior concentração provocou inibição de 71,5% (figura 54 A e B).

Efeitos semelhantes foram obtidos no crescimento da massa seca. Em *A. extraaxillaris* foi verificado que os extratos e frações inibiram o crescimento, e o maior efeito foi observado para a FAE, com 64,7% de inibição na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Efeito de 50% de inibição também foi observado para a FH na maior concentração ensaiada (figura 53 B).

O EEB e FAE das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também afetaram o crescimento da massa seca após 30 dias. A FAE das folhas provocou inibição de 44,3% na maior concentração ensaiada (figura 54 C). Para a FAE dos frutos de *M. foetidus*, os efeitos foram considerados mais intensos, uma vez que reduziu a massa seca em 58,6% na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 54 D).

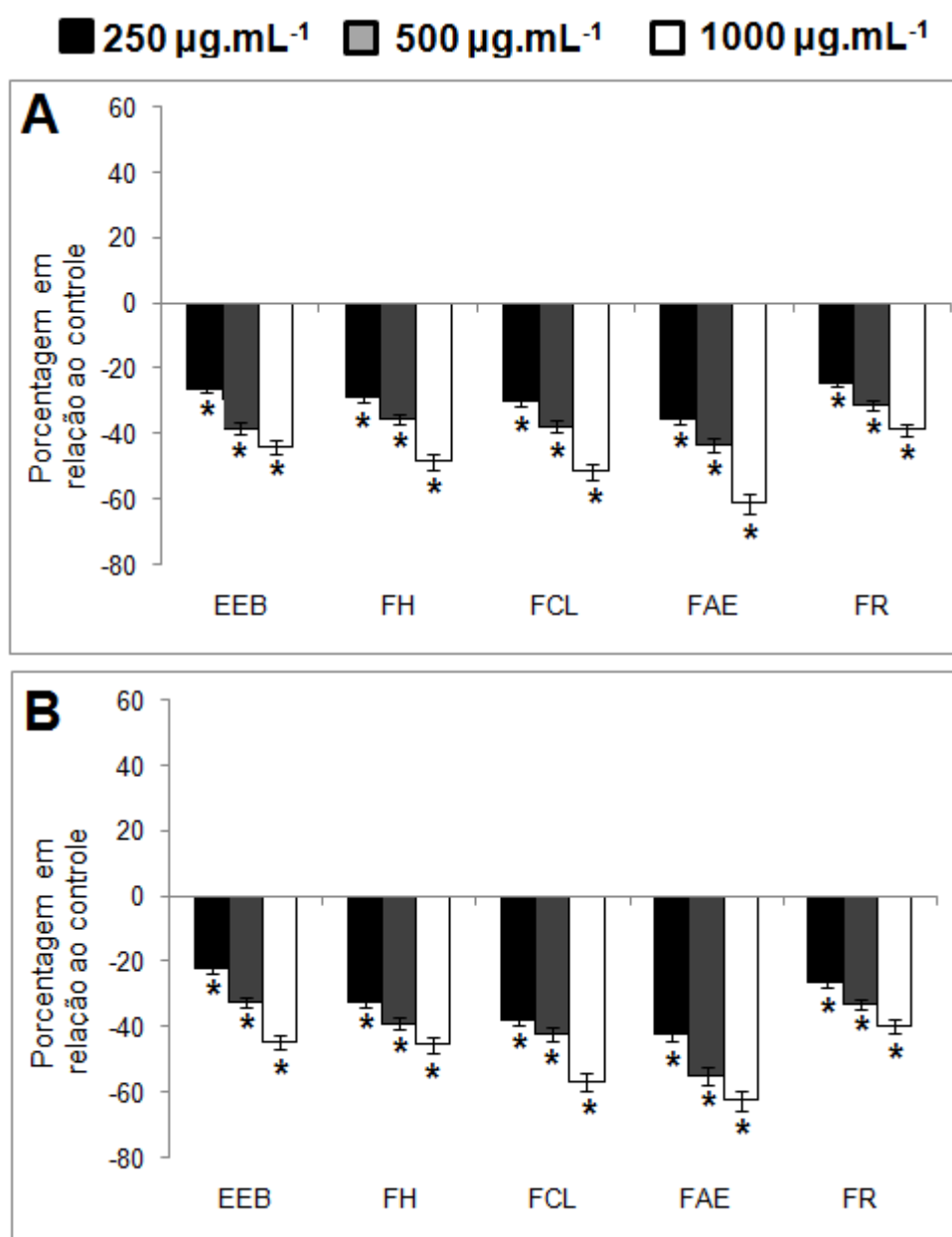


FIGURA 53. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FRM) DE *A. extraaxillaris* NO CRESCIMENTO DA RAÍZ (A) E MASSA SECA (B) DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

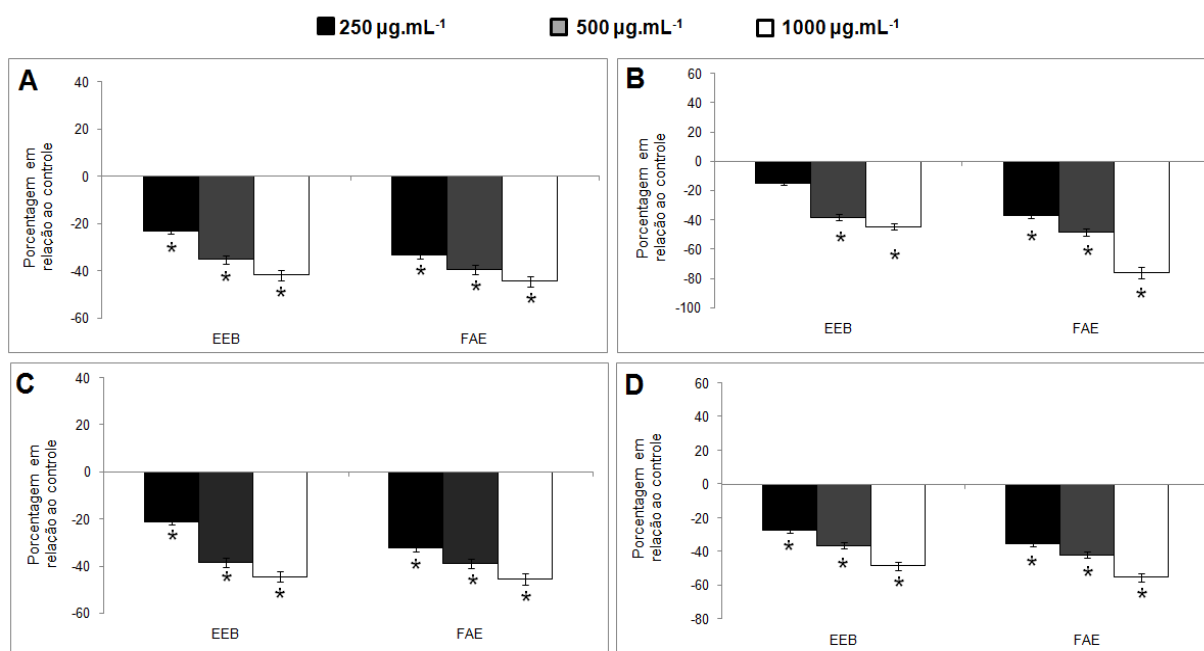


FIGURA 54. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS E FRUTOS DE *M. foetidus* NO CRESCIMENTO DA RAÍZ (A-FOLHAS, B-FRUTOS) E MASSA SECA (C-FOLHAS, D-FRUTOS) DE *C. argenteus* EM CASA DE VEGETAÇÃO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Esses resultados sugerem que essa fração apresenta substâncias com potencial alelopático, sendo que a redução acentuada da raiz pode afetar a capacidade competitiva e a produtividade da planta enquanto a redução da parte aérea pode diminuir a capacidade da planta competir por luz (NINKOVIC, 2003). O aumento de biomassa no sistema radicular visa melhor fixação da planta no substrato, aumentando assim o contato dos nutrientes por inteceptação radicular, levando a um rápido acúmulo destes pelas raízes (NINKOVIC, 2003). A literatura também relata que substâncias químicas podem afetar a permeabilidade da membrana, inibindo a absorção de água e nutrientes em altas concentrações (EINHELLIG, 2002). Esse efeito pode modificar a alocação de biomassa das plantas, fato esse observado nos bioensaios com o EEB e as FS em estudo.

### 5.9.13 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DOS EEB E FRAÇÕES EM CASA DE VEGETAÇÃO

Na avaliação do estresse oxidativo, foi verificado que o EEB e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* aumentaram a produção das enzimas antioxidantes em *C. argenteus*, sendo esse efeito dependente da concentração. Na atividade da catalase, foi verificado maior aumento para a FH ( $5.5 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$ ) em relação ao controle (figura 55 A). Assim como observado para *A. extraaxillaris*, a FAE das folhas também aumentou a atividade da catalase, com estímulo mais acentuado para a maior concentração ( $4,3 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$ ). A menor concentração ensaiada não provocou aumento significativo em relação ao controle (figura 56 A). Estímulo superior foi verificado para a FAE dos frutos, sendo observado aumento de  $6,7 \mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$  na maior concentração (figura 57 A).

Semelhante ao que foi observado na catalase, aumento significativo foi observado na produção da peroxidase e SOD para os extratos e frações de *A. extraaxillaris* e folhas e frutos de *M. foetidus*. A FAE das diferentes espécies foram responsáveis por maior estímulo da peroxidase, com valores iguais a  $8,7 \mu\text{mol.tetraguaiacol.min}^{-1}$  para *A. extraaxillaris*,  $6,9 \mu\text{mol.tetraguaiacol.min}^{-1}$  para as folhas e  $9,4 \mu\text{mol.tetraguaiacol.min}^{-1}$  para os frutos de *M. foetidus* na maior concentração (figuras 55 B, 56 B e 57 B). Apenas a maior concentração da FAE das folhas estimulou a produção de peroxidase (figura 57 B). Na SOD, estes valores foram iguais a  $5,9 \text{ U.mg}^{-1}$  e  $6,3 \text{ U.mg}^{-1}$  para a FAE de *A. extraaxillaris* e frutos de *M. foetidus*, na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figuras 55 C, 56 C e 57 C)

Estímulo na atividade da GSH também foi observado. Para *A. extraaxillaris* foi verificado um aumento para todas as frações, com maior estímulo para a FAE ( $2,9 \mu\text{mol.NADH.min}^{-1}$ ). A FAE dos frutos aumentaram a produção de GSH em  $4,9 \mu\text{mol.NADH.min}^{-1}$  na maior concentração (figura 55 D).

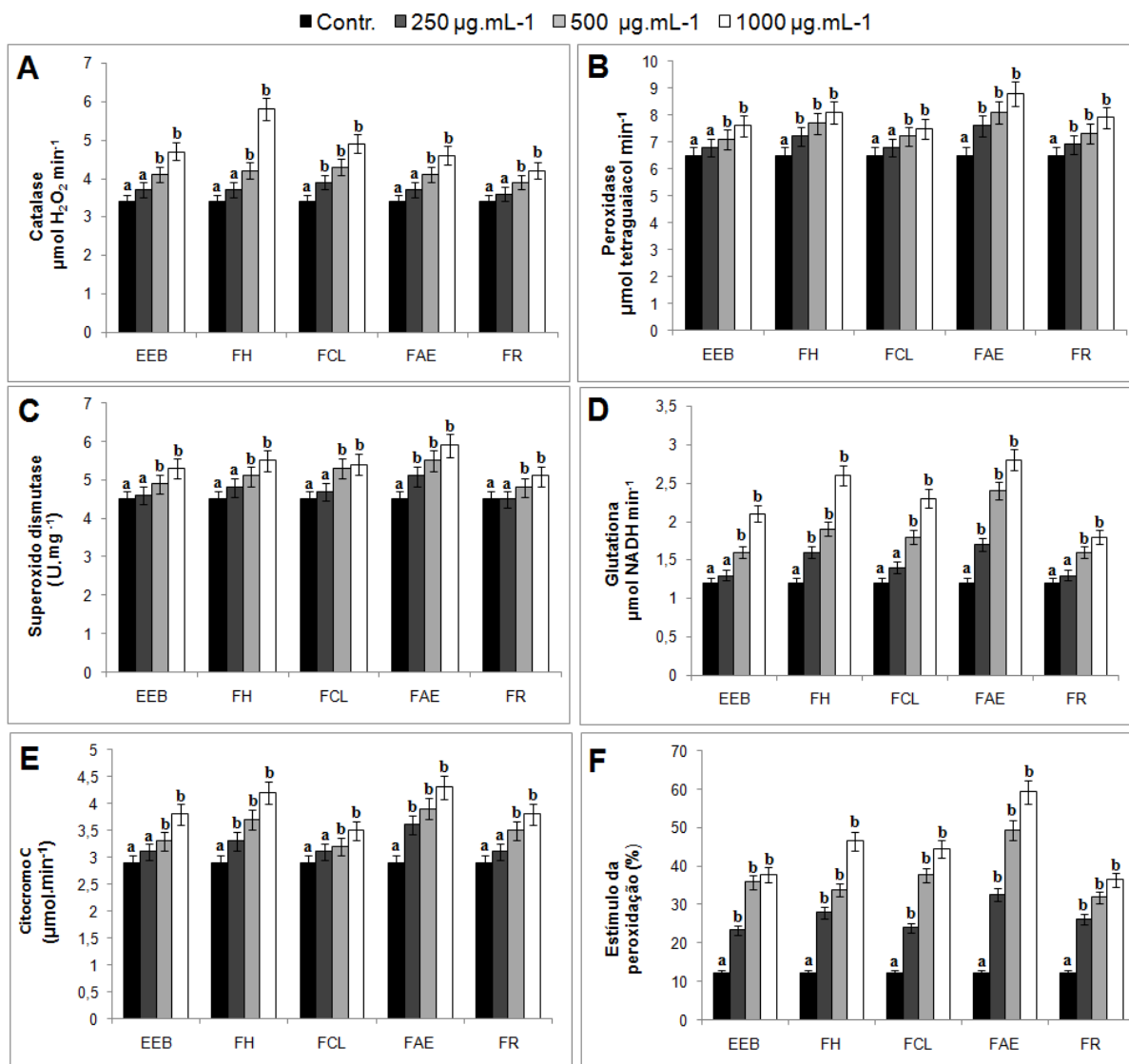


FIGURA 55. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO REMANESCENTE (FR) DE *A.extraaxillaris* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO (F) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

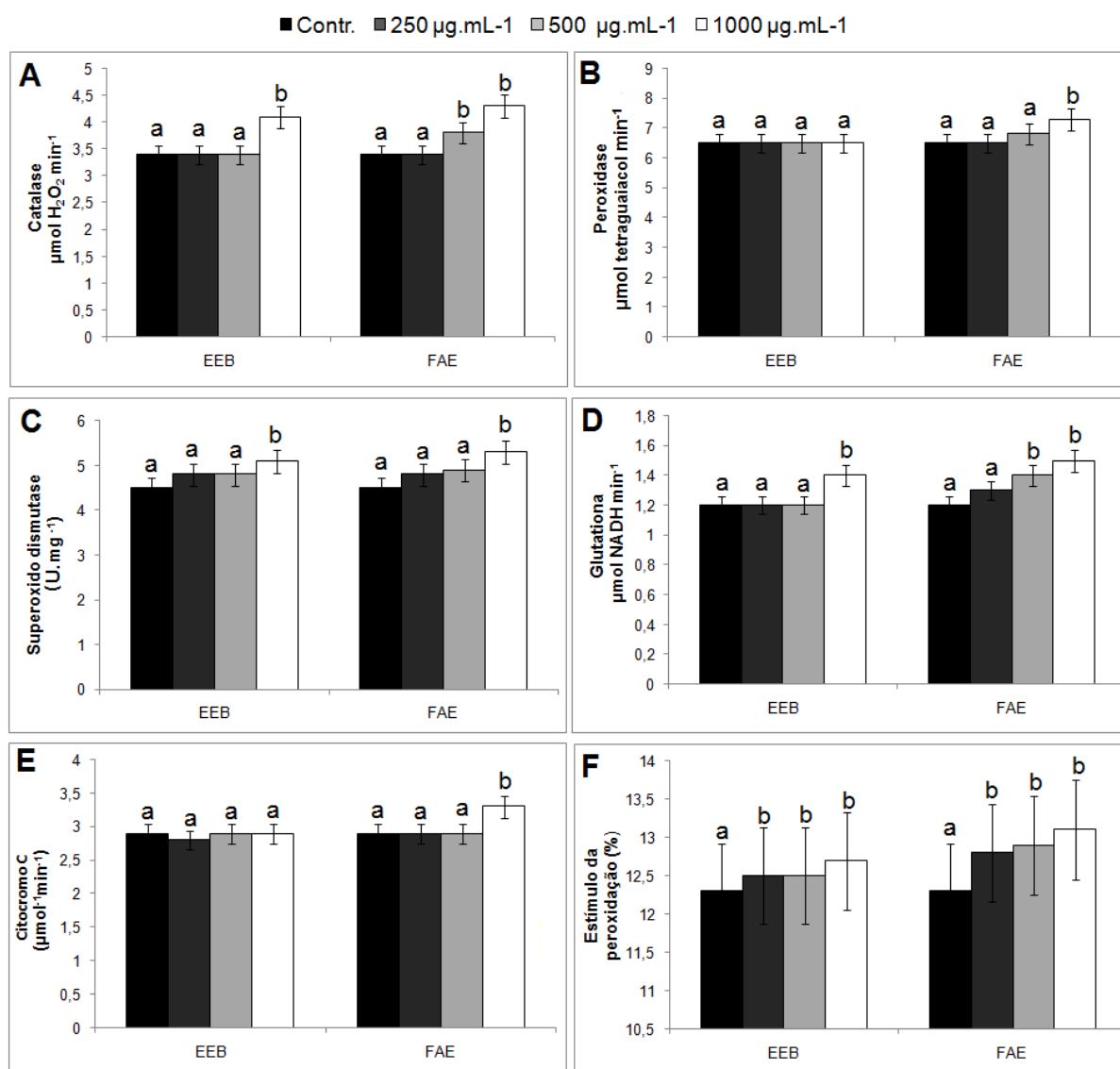


FIGURA 56. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (F) DE *C. argenteus* EM LABORATÓRIO. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

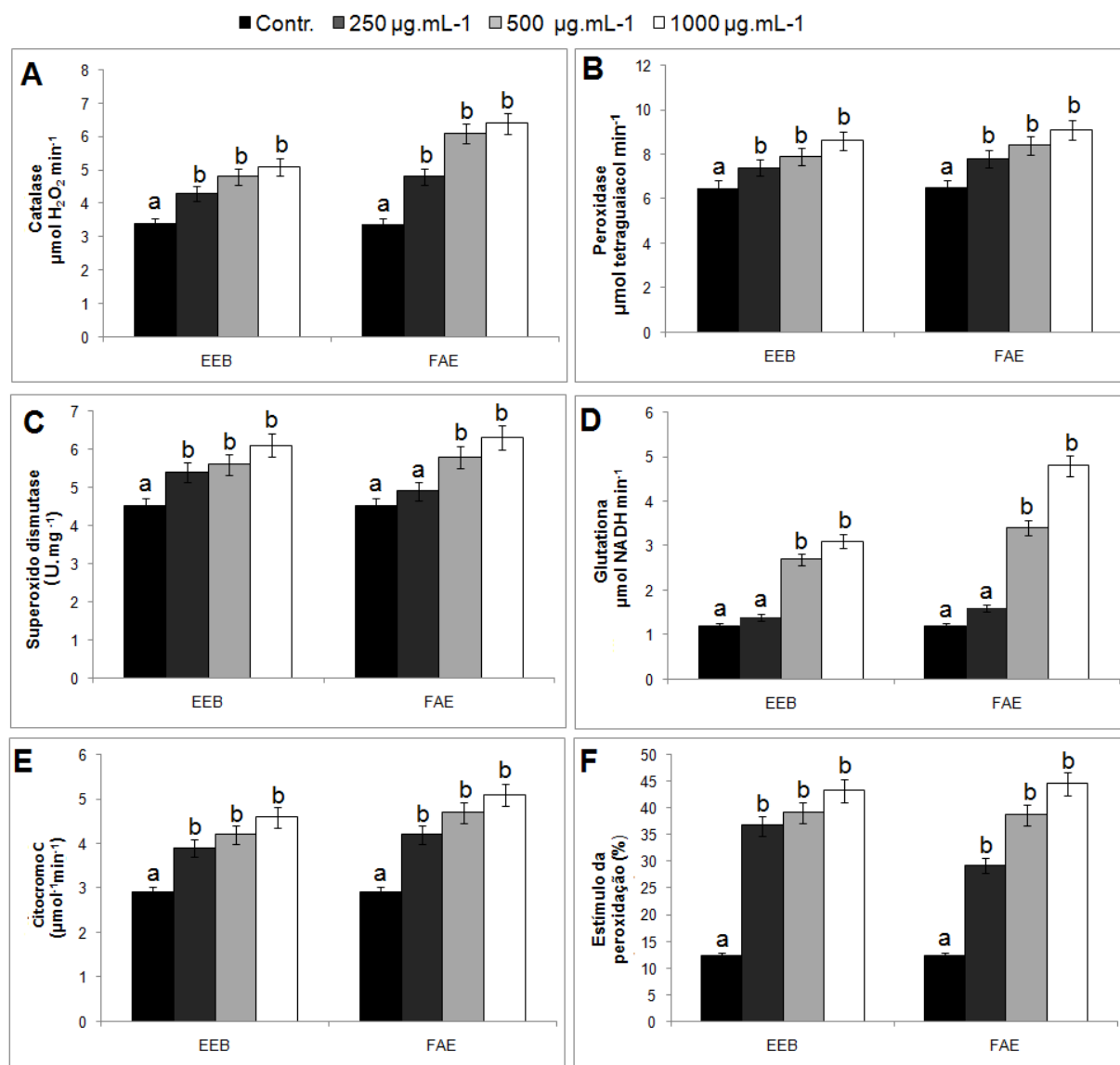


FIGURA 57. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus* NA ATIVIDADE DA CATALASE (A), PEROXIDASE (B), SUPERÓXIDO DISMUTASE (C), GLUTATIONA REDUZIDA (D), CITOCROMO- C (E) E ESTÍMULO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (F) DE *C. argenteus* em laboratório. \*MÉDIA DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Na mensuração da oxidação do citocromo C, foi semelhante para todas as frações de *A. extraaxillaris*. A FH e FAE apresentaram maior estímulo com 4,1 µmol.min<sup>-1</sup> e 4,4 µmol.min<sup>-1</sup> na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup> (figura 55 E). Para



folhas, tal atividade só aumentou para a concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da FAE ( $3,2 \mu\text{mol.min}^{-1}$ ) (figura 56 E) e nos frutos, um consumo maior foi observado com  $4,5 \mu\text{mol.min}^{-1}$  e  $5,1 \mu\text{mol.min}^{-1}$  para o EEB e FAE na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 57 E).

Na peroxidação lipídica, estímulos semelhantes aos observados para *A. extraaxillaris* ocorreram para os extratos e frações. A FAE aumentou a peroxidação em 59% na maior concentração (figura 55 E). Folhas de *M. foetidus* também estimularam a peroxidação lipídica, mas em menores proporções, com 12,8% e 13,2% para a maior concentração do EEB e FAE (Figura 56 E). O EEB e FAE dos frutos estimularam a peroxidação em 43,2% e 47,6% na maior concentração (Figura 57 E).

Plantas de *C. argenteus* se mostraram mais sensíveis quando tratadas com o extrato e frações de *A. extraaxillaris*, sendo tal fato constatado pelo aumento no estresse oxidativo. O aumento na ocorrência de catalase, peroxidase e SOD nas plantas em casa de vegetação, juntamente com a oxidação da via citocromo C sugere que a produção de espécies reativas de oxigênio é iniciada na emergência. Embora a contribuição relativa de cada processo não pode ser inferida a partir dos dados, todos estes processos têm sido anteriormente demonstrada pelo estímulo do estresse oxidativo em plantas submetidas a aleloquímicos (PORTA; ROCHA-SOSA, 2002; BLOKHIN *et al.*, 2003, PERGO; ISHI- IWAMOTO, 2011).

Nas plantas testadas, as atividades das enzimas aumentou em função da espécie e parte morfológica, refletindo um aumento da produção de ROS. A comparação das atividades das enzimas analisadas revelam que a SOD e catalase são provavelmente as principais enzimas antioxidantes envolvidas como antioxidantes em *C. argenteus* durante seu desenvolvimento. As espécies também contém enzimas que neutralizam o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tais como as peroxidases. Peroxidases existem em um grande número de formas de isoenzimas, e estão implicadas numa ampla variedade de processos fisiológicos (PASSARDI *et al.*, 2005). Peroxidases se ligam a polímeros da parede celular por interações iônicas ou covalentes, para participar na biossíntese de lignina e na formação da parede celular (QUIROGA *et al.*, 2000). Guaiacol peroxidase é considerada mais específica como indicadora de estresse oxidativo (ALMAGRO *et al.*, 2009).

A literatura relata que sorgoleona, uma substância presente no sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é capaz de inibir a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II (PSII) para fotossistema I (PSI), além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

Não se pode excluir, todavia que, mesmo sob a ação de enzimas antioxidantes, a peroxidação lipídica aumentou em resposta ao estresse oxidativo celular. A literatura relata que peroxidação lipídica ocorre juntamente com a respiração mitocondrial durante a germinação e emergência de sementes (STANIEK & NOHL, 1999), e seu início é uma das respostas imediatas para as mudanças na estrutura da membrana celular induzida pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (MOORE; SIEDOW, 1991; BAKER; ORLANDI, 1995; THALER, 1999; PORTA; ROCHA-SOSA, 2002; BLOKHIN *et al.*, 2003). Em síntese, a ocorrência de SOD, CAT e POD em plantass de *C. argenteus* é, provavelmente, relacionada com a produção ROS resultante da retomada do metabolismo mitocondrial durante a germinação e o crescimento.

Hao e Colaboradores (2012) examinou as alterações no nível de enzimas antioxidantes em *Cucumis* e observou que as enzimas que tiveram a atividade aumentada incluíam catalase e peroxidase. Estas são enzimas fundamentais para desintoxicar o  $H_2O_2$  para  $H_2O$  na célula. As alterações destas enzimas indicam que uma homeostase redox coordenada é essencial para regular o nível de ROS durante o estresse, o que requer a função combinada de várias enzimas antioxidantes. Este resultado é corroborado por outros trabalhos, em que o mecanismo de proteção em plantas contra estresses abióticos são focadas no estado oxidativo das plantas, e as atividades das enzimas antioxidantes incluindo CAT, POD, e SOD (PORTA; ROCHA-SOZA, 2002; BLOKHIN *et al.*, 2003).

## 5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

A atividade antineoplásica do extrato bruto e frações avaliadas pelo método da SRB em linhagens de células neoplásicas evidenciou que os resultados variaram em função do extrato, frações e da linhagem celular testada.

Foi verificado que a espécie *A. extraaxillaris* apresentou atividade antineoplásica relativa para o EEB e frações investigadas, e a FAE apresenta com IC<sub>50</sub> de a 7,5 µg.mL<sup>-1</sup> para a linhagem NCI-ADR/RES (câncer de ovário com fenótipo de resistência à múltiplas drogas) 8,5 µg.mL<sup>-1</sup> para a linhagem 786-0 (câncer de rim). Efeitos significativos também foram observados nas demais linhagens celulares, com efeitos pronunciados, como observado na tabela 27. O EEB e demais frações também apresentaram atividade considerável para algumas linhagens.

TABELA 27. ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA (IC<sub>50</sub>) µg/mL<sup>-1</sup> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*.

	U251*	MCF-7*	NCI-ADR/RES*	786-0*	NCI-H460*	OVCAR-3*	HT-29*	K562*	HACA T*
<b>Doxo</b>	0,036	0,076	1,1	0,25	<0,025	0,28	0,27	0,032	0,032
<b>EEB</b>	213,34	25	87,6	25	25	25	48,7	25	177
<b>FH</b>	51,46	25	25	25	25	25	25	25	58,7
<b>FCL</b>	167,21	25	25	25	25	25	25	25	38,7
<b>FAE</b>	31,33	13,5	7,5	8,5	13,7	15,3	25	23,7	25
<b>FR</b>	85,25	28,3	25	10,7	25	25	85,7	25	97,4

GI<sub>50</sub>: GROWTH INHIBITION 50 – CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA PARA QUE OCORRA 50% DE CRESCIMENTO. \*U251 (GLIOMA, SNC); MCF-7 (MAMA); NCI-ADR/RES (OVÁRIO, COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS); 786-0 (RIM); NCI-H460 (PULMÃO, TIPO NÃO PEQUENAS CÉLULAS); OVCAR-3 (OVÁRIO); HT-29 (COLON); K562 (LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA); HACAT (QUERATINÓCITO HUMANO, CÉLULA NORMAL IMORTALIZADA). DOXO: DOXORRUBICINA

Na atividade da FAE obtida das diferentes partes morfológicas, foi observado atividade antineoplásica para as linhagens celulares testadas. O extrato bruto das folhas não apresentou atividade antineoplásica considerável, uma vez que segundo o proposto por Itarath e Colaboradores (2004) a triagem de agentes

anticancerígenos busca a identificação de extratos obtidos a partir de produtos naturais que são considerados ativos quando apresentam  $IC_{50} \leq 30 \mu g.mL^{-1}$  L). Como demonstrado na tabela 28, o EEB das folhas apresentou  $IC_{50} > 250 \mu g.mL^{-1}$ , não sendo considerado tal efeito significativo.

Comparando-se os resultados obtidos, verifica-se que o extrato bruto das cascas e frutos, e as frações acetato de etila das folhas, cascas e frutos apresentaram atividades antineoplásicas promissoras nas linhagens celulares testadas. Entretanto a FAE dos frutos se mostrou mais eficiente, com maior atividade para NCI- ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas) ( $IC_{50} = 6,4 \mu g.mL^{-1}$ ) OVCAR3 (ovário) ( $IC_{50} = 8,3 \mu g.mL^{-1}$ ) e K562 (leucemia) ( $IC_{50} = 2,1 \mu g.mL^{-1}$ ). Quando se compara a atividade antineoplásica em uma linhagem de células normais e antineoplásicas a seletividade resultante foi mais significativa em células de leucemia k= K562, onde as frações acetato de etila das cascas e frutos apresentaram valores de  $IC_{50} = 1,5 \mu g.mL^{-1}$  para as cascas e  $IC_{50} = 1,5 \mu g.mL^{-1}$  para os frutos (Tabela 28).

TABELA 28. ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA ( $IC_{50}$ )  $\mu g.mL^{-1}$  DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidis*.

	U251*	MCF-7*	NCI-ADR/RES*	786-0*	NCI-H460*	OVCAR-3*	HT-29*	K562*	HaCat*
Doxo	0,036	0,076	1,1	0,25	<0,025	0,28	0,27	0,032	0,032
EEB –casca	241,5	24	160,7	>250	134,5	25	68,7	2,5	190,7
EEB - folhas	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250
EEB –frutos	25	25	25	25	25	25	25	25	25
FAE –casca	25	25	25	25	76,7	25	25	1,5	25
FAE –folhas	113,4	49	>250	25	167,9	181,4	73,5	11,5	95,3
FAE –frutos	25	10,8	6,4	25	25	8,3	25	2,1	25

GI<sub>50</sub>: GROWTH INHIBITION 50 – CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA PARA QUE OCORRA 50% DE CRESCIMENTO.  
 \*U251 (GLIOMA, SNC); MCF-7 (MAMA); NCI-ADR/RES (OVÁRIO, COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS); 786-0 (RIM); NCI-H460 (PULMÃO, TIPO NÃO PEQUENAS CÉLULAS); OVCAR-3 (OVÁRIO); HT-29 (COLON); K562 (LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA); HACAT (QUERATINÓCITO HUMANO, CÉLULA NORMAL IMORTALIZADA).

O uso de testes *in vitro* tem sido amplamente utilizado para pesquisa de agentes anticâncer. Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a

seletividade da droga em linhagens neoplásicas, utilizam-se linhagens normais (HOUGHTON *et al.*, 2007). O modelo de cultura de células tumorais humanas tem contribuído para revelar o potencial antitumoral de diversas substâncias isoladas a partir de espécies vegetais do Estado de Mato Grosso do Sul (SILVA *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2006; MATOS *et al.*, 2006). Além da rapidez na obtenção dos resultados, o ensaio é uma alternativa ao uso indiscriminado de animais pelas indústrias farmacêuticas ou de biotecnologia.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a FAE dos frutos apresenta seletividade para a linhagem K562 (leucemia mielóide crônica). Esse dado torna-se mais importante, uma vez que a descoberta de um quimioterápico específico para uma determinada linhagem tumoral irá, provavelmente, reduzir os efeitos colaterais provenientes da ação do quimioterápico em outras células.

A leucemia mielóide crônica é uma doença clonal maligna caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mielóide (fase crônica-FC), seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular (fase acelerada- FA) e terminando num quadro de leucemia aguda (fase blástica- FB). A leucemia mielóide crônica não é uma doença curável com terapia medicamentosa, nas fases FA e FB, sendo o transplante de medula óssea (aparentado ou não aparentado) a única modalidade curativa de tratamento (PEGGS *et al.*, 2003; DOBIN *et al.*, 2002).

Um outro dado observado importante a se destacar é a atividade frente à linhagem de células de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES que é uma linhagem resistente a múltiplas drogas, o que torna o seu tratamento difícil. O desenvolvimento de uma nova droga efetiva para essa linhagem é de extrema contribuição para o tratamento do câncer (LISCOVITCH *et al.*, 2007).

O câncer de ovário é a sétima causa mais comum de morte por câncer em mulheres de todo o mundo. O tratamento consiste em uma combinação de cirurgia de redução de volume e quimioterapia baseada em platina isoladamente ou combinada com paclitaxel. Entre 55% e 75% das mulheres que respondem a terapia de primeira linha tem a recidiva dentro de dois anos. A segunda linha é paliativa e corresponde a quimioterapia e visa reduzir os sintomas e prolongar a sobrevivência (HALDAR, 2011). Quando o câncer é da linhagem resistente à múltiplos fármacos, o tratamento é ainda mais delicado, ficando a equipe de saúde sem opção para terapêutica medicamentosa.

Outro fator que pode ser considerado, para os extratos e frações que apresentaram diferenças de  $IC_{50}$  entre as linhagens utilizadas no estudo é a presença de receptores nas membranas celulares. O receptor é uma entidade conceptual para explicar a natureza da interação do fármaco com organismos vivos produzindo determinado efeito biológico. A capacidade do fármaco adaptar-se ao receptor depende das características estruturais, configuracionais e conformacionais de ambos, fármaco e receptor; entretanto, conhecer as forças de interação que os ligam aos receptores por métodos experimentais é muito difícil (SILVA, 2002).

Além disso, podem existir vários receptores para uma mesma substância ou extratos em tecidos diferentes, como é o caso do receptor nicotínico da acetilcolina, também chamado canal nicotínico de acetilcolina, este nome é usado para diferenciar esse receptor de outros receptores de acetilcolina que funcionam de modo diferente (FRANCIS, 1999).

As diferenças genéticas e morfológicas das células neoplásicas podem interferir no desenvolvimento de uma determinada metodologia para pesquisa de novas drogas. Quando os compostos são avaliados em um número maior de linhagens e provenientes de diferentes tipos histológicos, que expressam diferentes receptores, as possibilidades de identificação de agentes com atividade anticâncer aumentam. Isto pode ser exemplificado pelas diferenças na estrutura da membrana que ocorre nas linhagens de células neoplásicas B16-F10 e B16-F1 de melanoma (SCHROEDER, 2003).

Diante de tais questões, o NCI (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos) contempla várias linhagens celulares tumorais humanas de um mesmo tipo histológico de célula (por exemplo, 14 diferentes linhagens de células neoplásicas de mama poderiam ser similares a 14 pacientes requeridos para a fase II da triagem clínica) com o propósito de aproximar-se da heterogeneidade observada na clínica (VON HOFF, 1985). Desta forma, sabendo-se das características únicas de cada neoplasia, pode-se inferir que as diferenças de comportamento dos compostos entre as diferentes linhagens também podem estar associadas às diferenças estruturais e químicas de suas membranas.

## 5.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A comparação dos resultados do EEB e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* evidenciam um aumento inespecífico da atividade antimicrobiana, uma vez que não foi constatada especificidade para determinada bactéria ou fungo, aqui investigado. Para as bactérias testadas, apenas *Staphylococcus aureus* apresentou CIM ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para todos os extratos e frações de *A. extraaxillaris*, sendo os mesmos valores obtidos para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Sacharomices cerevisiae* (Tabela 29). Entretanto a FH, apresentou maior atividade para *Shigella sonnei* (CIM  $125 \mu\text{g.mL}$ ) (tabela 30).

TABELA 29. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	500	500	250	500	500	500	500	500
<b>FH</b>	250	500	250	>500	250	>500	250	500
<b>FCL</b>	250	500	500	500	250	500	250	500
<b>FAE</b>	500	500	250	500	500	500	500	500
<b>FEA</b>	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500
<b>Padrão</b>	4,23		3,12	-	3,12	-	4,22	-
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	500	500	500	500	500	500	250	>500
<b>FH</b>	250	250	250	>500	125	>500	250	>500
<b>FCL</b>	500	500	500	500	500	500	500	500
<b>FAE</b>	500	500	500	500	500	500	250	500
<b>FR</b>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500
<b>Padrão</b>	3,12		3,12	-	3,12	-	4,22	-

Nota: Padrão utilizado= Cloranfenicol

TABELA 30. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Sacharomices cerevisiae</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	250	500	250	500	250	500	500	500
<b>FH</b>	250	500	250	>500	250	500	500	500
<b>FCL</b>	250	500	250	500	250	500	500	500
<b>FAE</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>FR</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>Padrão</b>	10,3	-	10,3	-	5,15	-	-	-

Nota: Padrão utilizado= Nistatina

Estes resultados indicam uma possível concentração das substâncias ativas na fração hexânica, frente a estes microrganismos. Os dados obtidos estão de acordo com os relatos encontrados na literatura, que descrevem a atividade antimicrobiana contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (LALL; MEYER, 1998) e *Candida albicans* (MOTSEI *et al.*, 2003), expostas a diferentes extratos vegetais.

Os extratos e frações das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também apresentaram atividade diversificada frente às bactérias e aos fungos testados. Foi observado que a FH das folhas apresentou acentuada atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (CIM 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ /CLM 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *Klebsiella pneumoniae* (CIM 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ /CLM 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A FCL, FAE e FR também apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* com CIM igual a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 31).

O EEB e frações das cascas também demonstraram potencial antimicrobiano. A FH, FCL e FAE causaram inibição do crescimento em *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella pneumoniae* (CIM 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (tabela 32). A atividade antimicrobiana sobre fungos também foi observada. O EEB, FH, FCL e FAE das folhas e cascas se mostraram eficazes na inibição de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Sacharomices*



*cerevisae* e *Cryptococcus neoformans* (CIM 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) conforme observado nas tabelas 33 e 34.

TABELA 31. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS DE *M.foetidus*, EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	500	>500	500	>500	500	>500	>500	-
<b>FH</b>	>500	>500	125	125	250	>500	>500	-
<b>FCL</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500
<b>FAE</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500
<b>FR</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500
<b>Padrão</b>	4,23		3,12	-	3,12	-	4,22	-
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	500	>500	>500	-	500	>500	500	>500
<b>FH</b>	>500	-	250	>500	>500	-	125	125
<b>FCL</b>	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500
<b>FAE</b>	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500
<b>FR</b>	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500
<b>Padrão</b>	4,23		3,12	-	3,12	-	4,22	-

Nota: Padrão utilizado= Nistatina

TABELA 32. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) E ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus*, EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Sacharomices cerevisae</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	>500	-	250	500	250	250	250	500
<b>FH</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>FCL</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>FAE</b>	250	500	250	500	250	>500	250	500
<b>Padrão</b>	10,3	-	10,3	-	5,15	-	-	-

Nota: Padrão utilizado= Nistatina

TABELA 33. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS CASCAS DE *M. foetidus*, EM BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	>500	-	>500	-	250	>500	>500	-
<b>FH</b>	250	>500	250	500	250	500	250	500
<b>FCL</b>	250	500	250	500	250	500	250	>500
<b>FAE</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500
<b>FR</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	>500	-	250	>500	>500	-	>500	-
<b>FH</b>	250	>500	250	500	250	500	250	500
<b>FCL</b>	250	500	250	500	500	>500	250	500
<b>FAE</b>	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500
<b>FR</b>	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500
<b>Padrão</b>	10,3	-	10,3	-	5,15	-	-	-

Nota: Padrão utilizado= Cloranfenicol

TABELA 34. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS CASCAS DE *Microlobius foetidus*, EM FUNGOS, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM), EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Sacharomices cerevisiae</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>EEB</b>	250	500	250	>500	>500	-	250	>500
<b>FH</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>FCL</b>	250	500	250	500	250	500	250	500
<b>FAE</b>	250	>500	250	>500	500	>500	250	500
<b>FR</b>	250	>500	250	>500	125	500	250	500
<b>Padrão</b>	10,3	-	10,3	-	5,15	-	-	-

Nota: Padrão utilizado= Nistatina

As diferenças de CIM observadas podem ser atribuídas à composição química dos antimicrobianos vegetais testados, e isto têm justificativa sob vários aspectos edafo-climáticos (época de colheita, horário, localidade, entre outros fatores) que alteram a produção dos compostos ativos nas plantas. Esta afirmação encontra suporte em estudo de Gobbo-Netto e Lopes (2007), que relatam a influência dos fatores ambientais na produção dos compostos secundários das plantas, resultando em produtos vegetais com diferentes composições químicas e com isto capacidades distintas para inibição de crescimento microbiano.

Cortiglia e Colaboradores (2001), estudando folhas da planta *Daphne gnidium*, observaram a maior atividade do extrato total, com considerável teor de flavonóides dentre eles a luteolina, orientina, isoorientina, apigenina e 2,5,7,4'-tetrahidroxisoflavanol. Embora também não tenha sido objetivo desta pesquisa verificar a ação antimicrobiana dos produtos vegetais especificamente sobre linhagens resistentes, ou mesmo multiresistentes, os resultados aqui obtidos apontam para o potencial de uso destas plantas como agentes antimicrobianos, embora a forma de utilização ainda mereça atenção especial, visando estabelecer economicamente a melhor forma de preparo de cada derivado vegetal.

A obtenção de um efeito antimicrobiano de extratos vegetais é interessante na busca de novos fármacos com diferentes modos de atuação sobre os microrganismos patogênicos, uma vez que super infecções por microrganismos ultra-resistentes têm sido observadas rotineiramente. Sendo assim, já que a fração utilizada apresenta uso limitado devido a sua solubilidade, torna-se interessante, como etapas futuras, a purificação e determinação das substâncias que possam exercer a atividade antimicrobiana.

## 5.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.12.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL)

O radical DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazila) é estável e apresenta coloração púrpura, porém, quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras e padrões (Rutina e Vitamina C) em reduzir o radical DPPH. Foram preparadas e testadas cerca de quatro a cinco concentrações para as amostras testadas. A porcentagem de inibição do DPPH foi determinada a partir da leitura das absorbâncias à 518 nm de cada concentração. Também foi calculado, por regressão linear (a partir da equação da reta do gráfico obtido para cada amostra), o IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides (ALVES *et al.*, 2010).

O IC<sub>50</sub> determina a concentração da amostra que é capaz de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, e foi calculada com base na equação da reta obtida das curvas de concentração de cada amostra com a porcentagem de inibição do DPPH produzida. Este processo é denominado de regressão linear, e as equações foram consideradas confiáveis somente quando o valor de R<sub>2</sub> (linearidade da reta) foi superior a 0,98. A figura 58 representam as curvas das concentrações utilizadas de cada amostra para a redução do DPPH, empregadas na construção dos gráficos para o cálculo de IC<sub>50</sub> (os resultados estão expressos como média ± desvio padrão).

Na figura 58, são representados os valores utilizados na construção da curva dos padrões vitamina C e Rutina. Para a construção da curva, foram utilizadas concentrações de rutina entre 2 a 10 µg.mL<sup>-1</sup>, e a obtenção da curva de vitamina C, as concentrações utilizadas variaram entre 1,6 a 8 µg.mL<sup>-1</sup>. Nas curvas obtidas para o EEB, FCL e FR de *A. extraaxillaris*, foi verificado que as concentrações que apresentaram atividade antioxidante variaram entre 15 a 100 µg.mL<sup>-1</sup> (figura 58).

Uma maior porcentagem de redução do DPPH foi observado para a FAE, onde tais concentrações variaram entre 15 a 85 µg.mL<sup>-1</sup> (figura 58). A fração hexânica não demonstrou potencial antioxidante pelo método analisado. O aumento nas concentrações para cada extrato e fração demonstra menor atividade antioxidante.

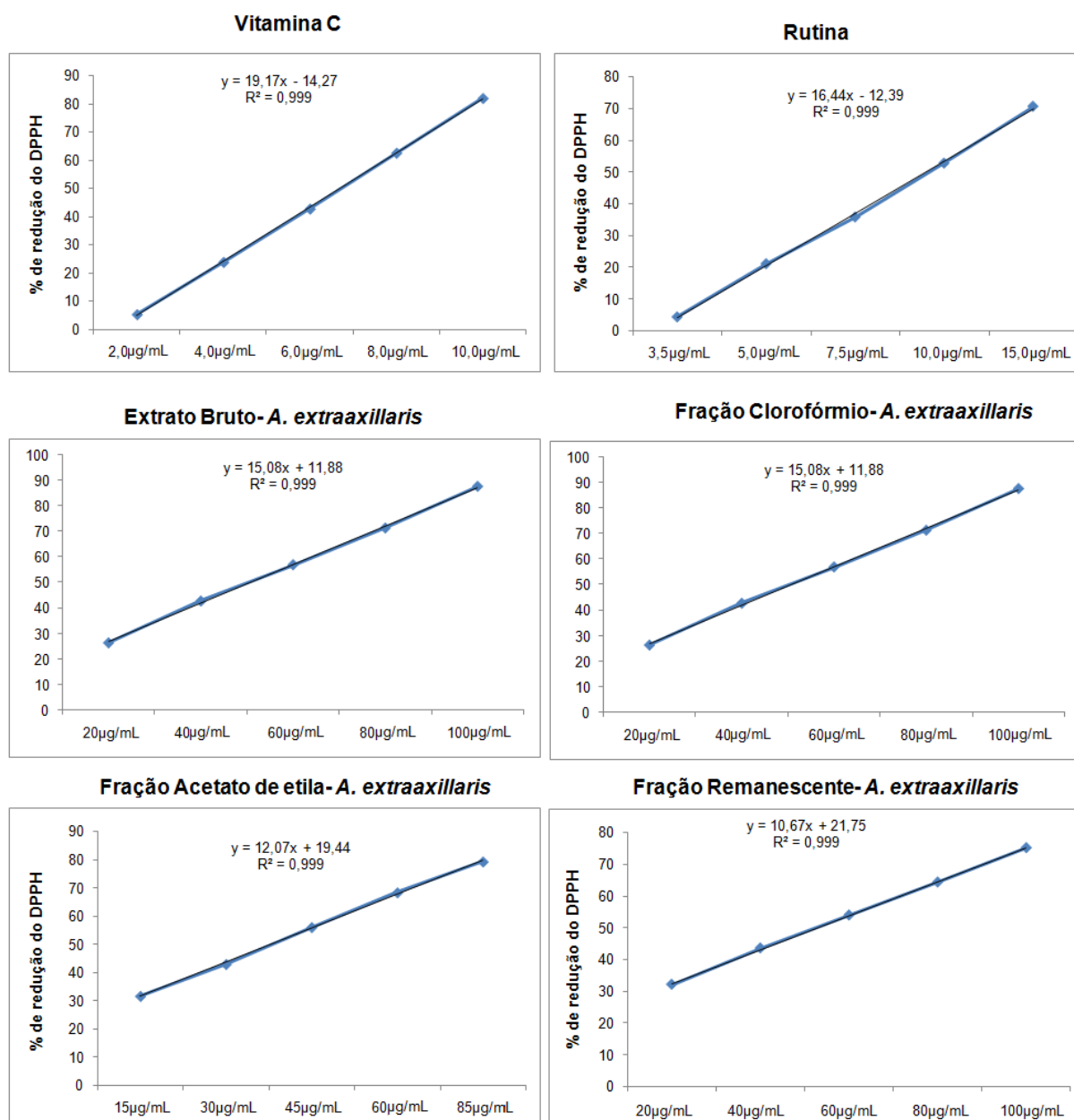


FIGURA 58. CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris*, NA REDUÇÃO DO DPPH.

A avaliação da atividade antioxidante frente o método DPPH para as diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* demonstram maior atividade no seqüestro do DPPH, quando comparado aos resultados obtidos para *A. extraaxillaris*. Nas folhas, a quantidade de extrato utilizada na atividade antioxidante variou entre 2,0 a 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (figura 59). Entre os resultados obtidos para as

diferentes partes morfológicas é observado que a FAE demonstrou ser mais efetiva, uma vez que apresentou valores que variaram entre 2,0 até 9,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (figura 59).

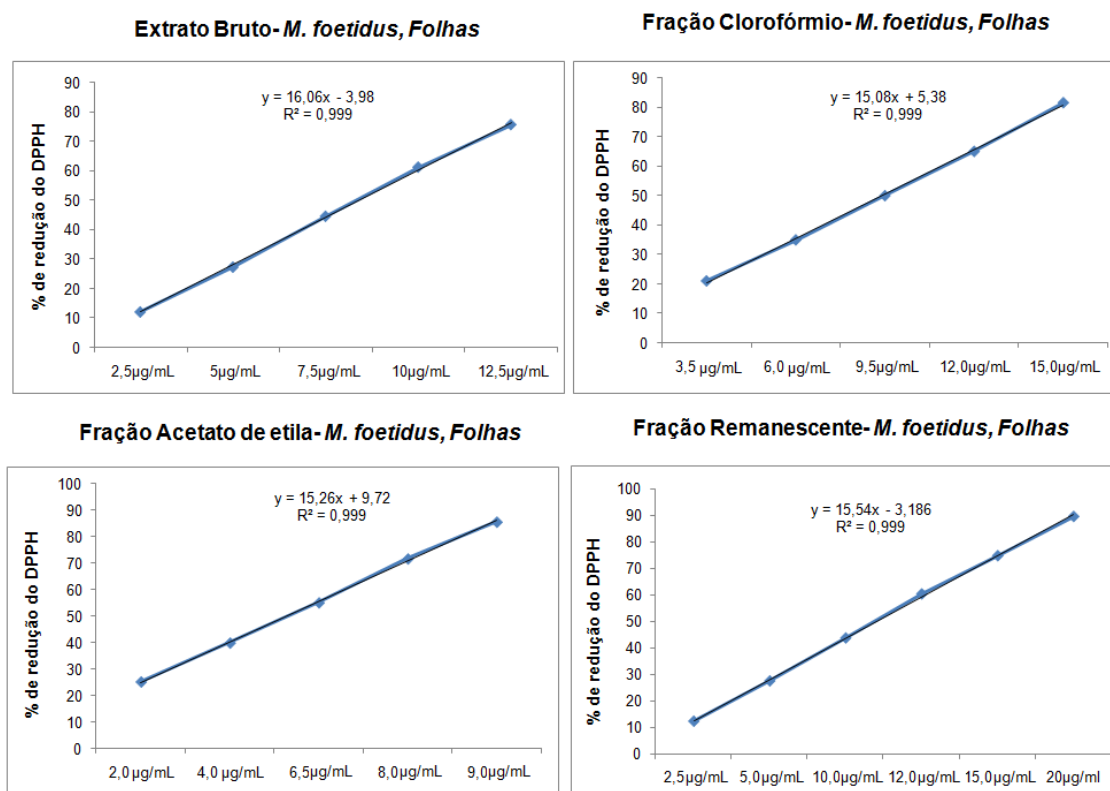


FIGURA 59. CURVA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS FOLHAS DE *M. foetidis* NA REDUÇÃO DO DPPH.

Cascas de *M. foetidis* também demonstraram atividade antioxidante frente a este método, com concentrações que variaram entre 5,0 a 120  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 60). Nos resultados obtidos, é verificado que a FCL, FAE e FR tiveram resultados similares, com concentrações que variaram de 5,0 a 35  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Frutos de *M. foetidis* apresentaram concentrações de 1,0 a 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  necessários para provocar atividade antioxidante (Figura 61).

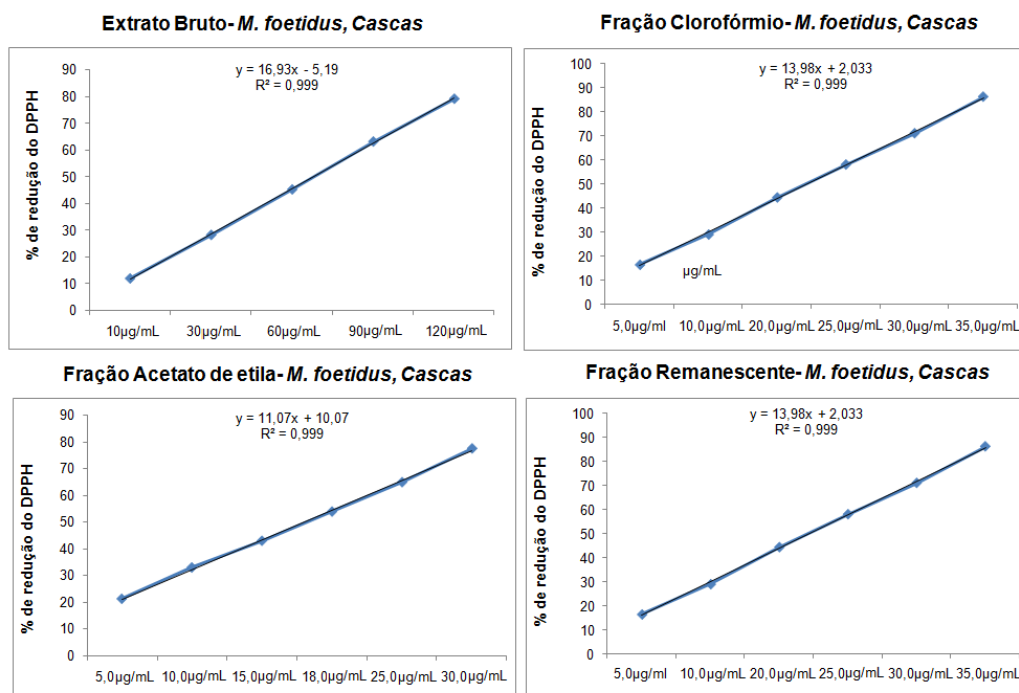


FIGURA 60. CURVA EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE *M. foetidus* NA REDUÇÃO DO DPPH.

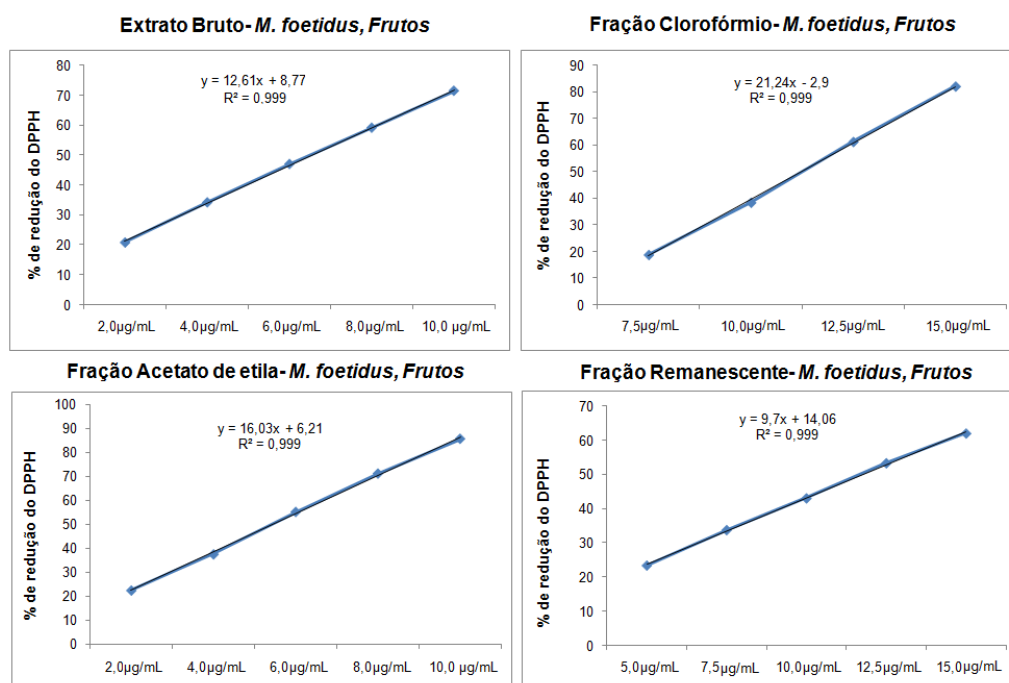


FIGURA 61. CURVA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DOS FRUTOS DE *M. foetidus* NA REDUÇÃO DO DPPH.

O extrato bruto e frações obtidos de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* demonstraram atividade seqüestrante de radicais DPPH• que reduzem na presença de moléculas antioxidantes. Ao compararmos a capacidade antioxidante pelos diferentes extratos utilizados, observamos que houve variações dependentes da espécie e parte morfológica utilizada. Quando comparamos o IC<sub>50%</sub> de cada espécie, é verificado que a FAE de *A. extraaxillaris* apresentou IC<sub>50%</sub> igual a 42,3 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo considerada a fração com maior potencial antioxidante frente à este método (figura 62). A atividade também variou para a espécie *M. foetidus*. A FAE das folhas apresentou IC<sub>50%</sub> igual a 9,03 µg.mL<sup>-1</sup>. Valores de IC para a FAE das cascas foram maiores para a FAE das cascas, com 18,92 µg.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, valores mais significativos foram obtidos para os frutos de *M. foetidus*. Foi verificado que o EEB (5,06 µg.mL<sup>-1</sup>) e FAE (4,08 µg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram valor de IC<sub>50%</sub> semelhantes à vitamina C (5,04 µg.mL<sup>-1</sup>), indicando alto potencial antioxidante frente a este método (Figura 62).

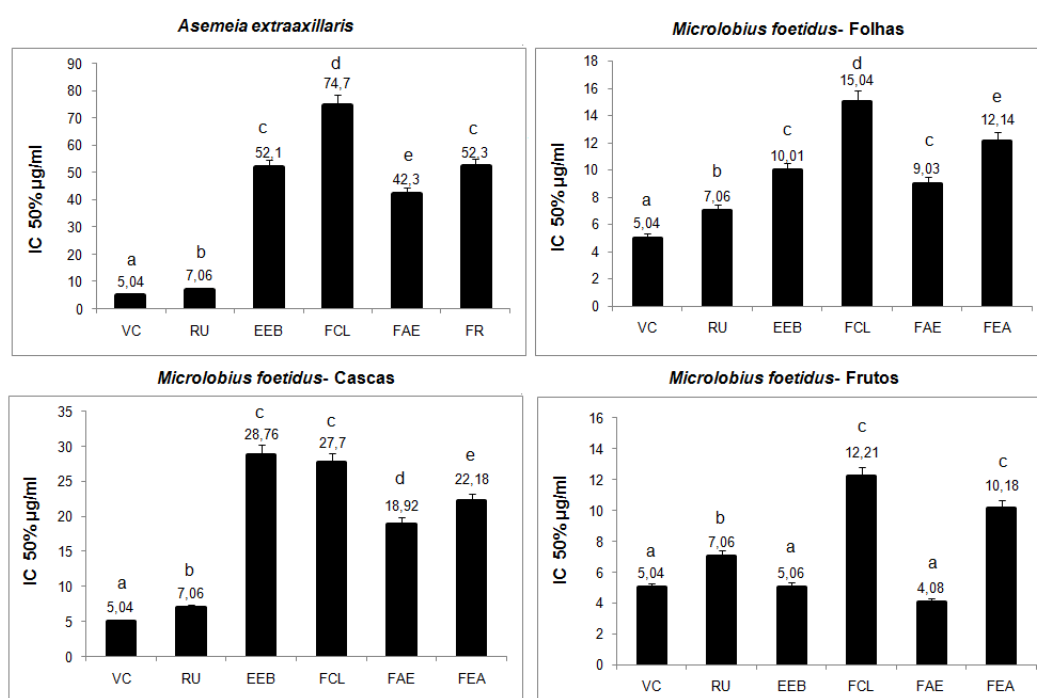


FIGURA 62. IC<sub>50</sub> DOS PADRÕES VITAMINA C (VC) E RUTINA (RU), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE DE *Asemeia extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus*. \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05).



A Rutina, utilizada como padrão, é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas, em especial a antioxidante. De acordo com Afanas'ev e Colaboradores (1989) este flavonóide têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, além de não apresentarem toxicidade. A atividade antioxidante de compostos fenólicos como a rutina deve-se principalmente às propriedades redutoras e estrutura química, neutralizando ou seqüestrando os radicais livres e quelando metais de transição, agindo tanto na etapa inicial como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.* 2004). Neste contexto, compostos presentes nesta fração podem constituir fonte promissora de substância antioxidante, já que a FAE e EEB apresentaram IC<sub>50%</sub> menor que a Rutina, demonstrando serem mais ativos. Miliauskas e Colaboradores (2003) demonstraram que extratos com alta capacidade de captação frente ao radical DPPH apresentam uma absorção residual permanente podendo equivaler até aproximadamente 7% da absorção total final.

Analisando os resultados obtidos observa-se em comum a atividade antioxidante da FAE. Sabe-se que flavonóides são um grupo de metabólitos majoritariamente encontrados na fração acetato de etila (FALKENBERG *et al.* 2004) característicos da família Fabaceae (SILVA; CECHINEL-FILHO 2002; MAIA NETO *et al.* 2008) e Polygalaceae (WU *et al.*, 2007) com atividade antioxidante descrita. O flavonóide Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosideo presente em ambas as famílias apresentou significativa atividade antioxidante pelo método DPPH (PARK *et al.*, 2006).

Brand-Williams e Colaboradores (1995) afirmam que a interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, para a maioria dos extratos e frações testados o mecanismo parece ser muito mais complexo, necessitando de um estudo posterior mais aprofundado.

#### 5.12.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBÊNIO

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante frente ao método do complexo fosfomolibdênio são demonstrados na figura 63. O EEB, FH e FCL tiveram atividades superiores a 50% em relação à vitamina C, com valores de 57,61% para o EEB, 68,78% para a FH e 89,34% para a FCL. A FAE (42,64%) e FR (42,13%) demonstraram considerável atividade, mas não expressaram 50% de atividade em relação à vitamina C (figura 63). As diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também demonstraram potencial antioxidante pelo método utilizado. O EEB (78,6%) e FCL (87,6%) das folhas tiveram maior atividade quando comparados as demais frações e padrão rutina. A FAE também expressou atividade igual a 55%. As cascas de *M. foetidus* também apresentaram percentual antioxidante similar, com atividade superior para a FCL (88,72%) e FAE (81,03%). O EEB (88,92%), FCL (67,62%), FAE (92,21%) e FR (78,27) demonstraram maior atividade antioxidante, com valores superiores a 50%. Para as diferentes partes morfológicas de *M. foetidus*, a atividade antioxidante da FH foi menor quando comparadas as demais frações (figura 63).

O ensaio antioxidante pelo método do complexo fosfomolibdênio é amplamente utilizado, uma vez que mede a inibição do molibdato de amônio pela ação de um extrato ou substância. O molibdato de amônio é citado na literatura como um agente tóxico, uma vez que possui efeitos adversos sobre a hematologia (diminuição no número de leucócitos e aumento de eritrócitos) e disfunções hepáticas em seres humanos (PANDEY *et al.*, 2009). Além disso, o protocolo de segurança da substância molibdato de amônio relata que o molibdênio por ser um co-fator da enzima xantina oxidase pode causar alterações bioquímicas que podem predispor trabalhadores em exposição à este produto à gota (acúmulo de cristais de ácido úrico articulações) (QUIRIOS, 2013). Dessa forma, os dados aqui obtidos demonstram o alto potencial antioxidante das frações em estudo. Cabe salientar que estes resultados contribuem para o direcionamento de estudos clínicos sobre os efeitos protetores dos extratos e frações em estudo.

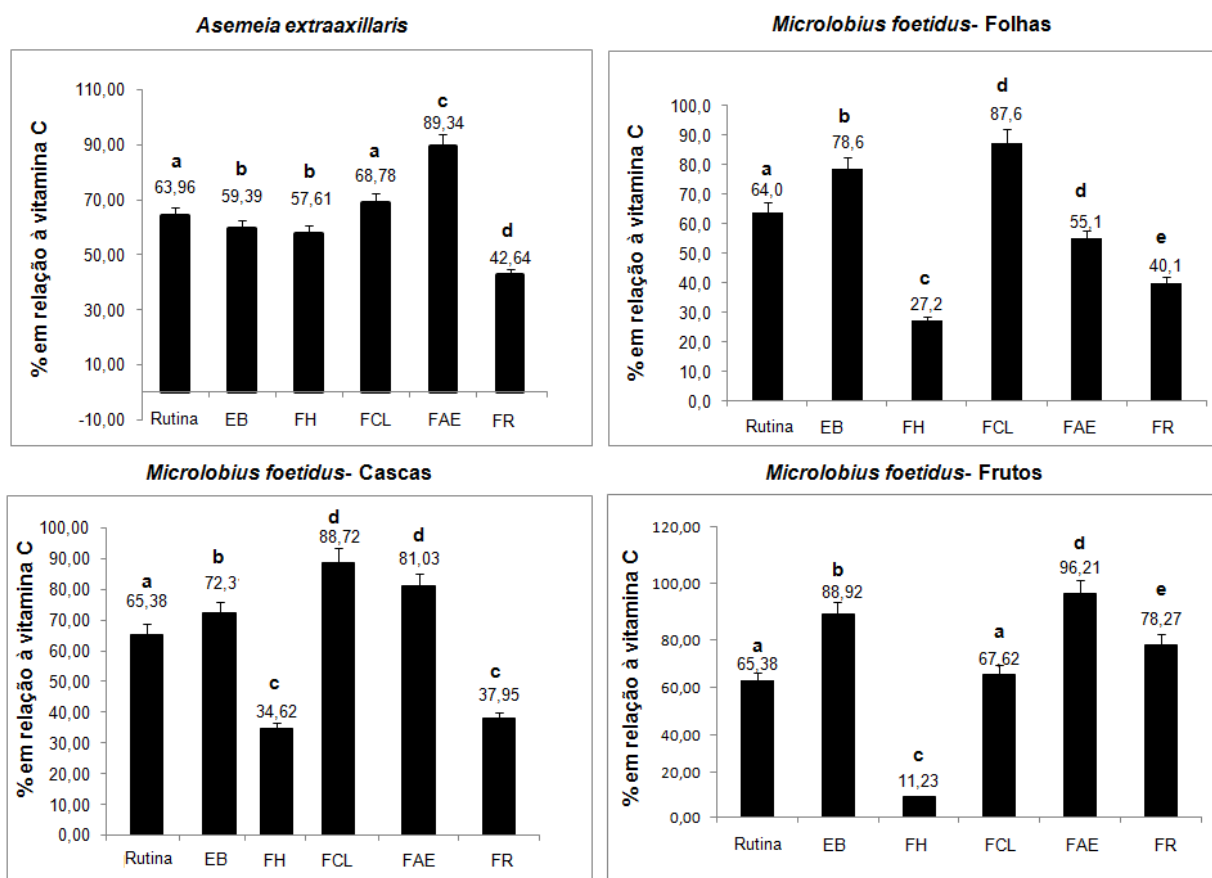


FIGURA 63. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS PADRÕES RUTINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *Asemeia extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus* EM RELAÇÃO AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.\*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

### 5.12.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA).

A capacidade de redução de uma fração serve como um indicador de seu potencial antioxidante. Na avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor (Azul da Prússia) foi verificado potencial antioxidante para o EEB e FS de *A. extraaxillaris*. O EEB demonstrou atividade antioxidante semelhante ao padrão rutina

(83,21%). A FAE apresentou atividade antioxidante superior ao padrão (89,23%) e a FH mesmo que em menor atividade, apresentou 51,23% de atividade (figura 64).

Folhas e cascas de *M. foetidus* também apresentaram atividade antioxidante pelo método utilizado. O EEB de ambas as partes morfológicas apresentaram potencial antioxidante semelhantes à rutina (81,5%-folhas, 86,29%- cascas). A FAE das folhas apresentou atividade igual a 75,3% e a FCL e FR das cascas apresentaram 58,12% e 56,03% de atividade respectivamente. As demais frações não apresentaram 50% de atividade em relação à vitamina C. O EEB e a FAE dos frutos de *M. foetidus* também apresentou atividade antioxidante semelhante ao padrão rutina (81,24% e 89,81%, respectivamente). Embora a FCL e FR não tenham apresentado atividade semelhante à rutina, os valores de atividade foram superiores a 50% (76,33% e 56,43%, respectivamente), como demonstrado na figura 64.

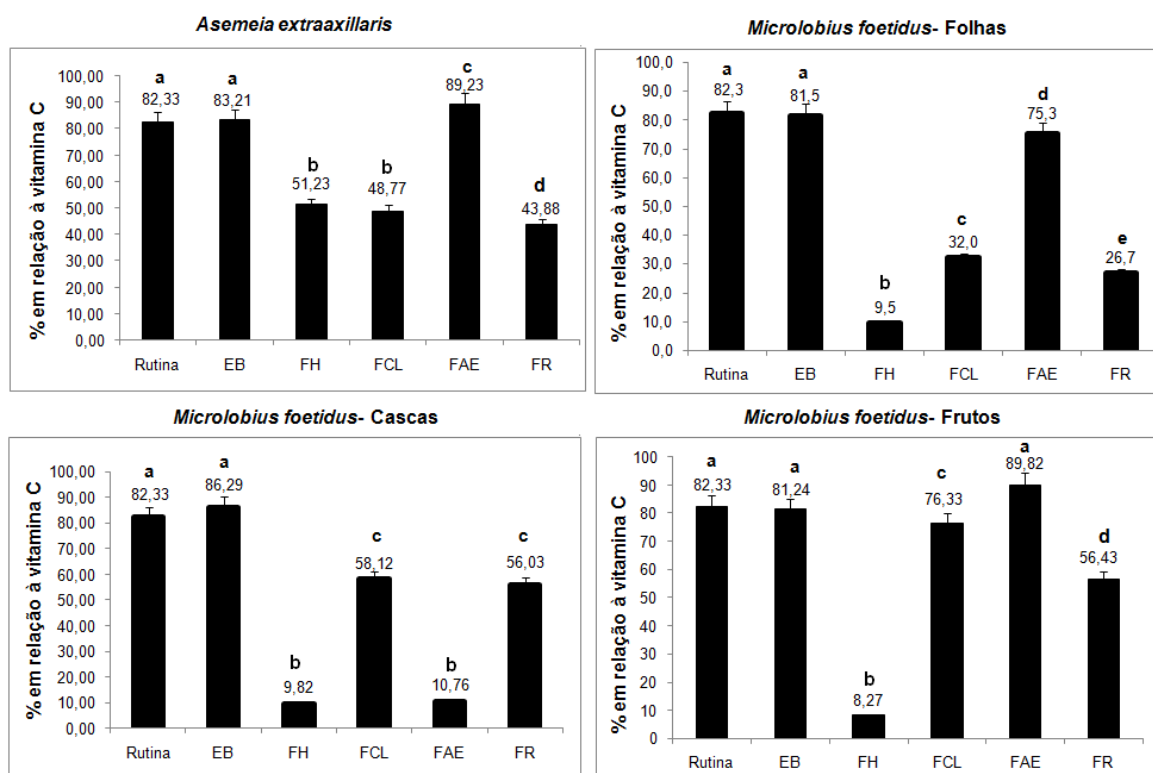


FIGURA 64. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS PADRÕES RUTINA, BHT, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) De *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* EM RELAÇÃO AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA). \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Os métodos baseados na redução do  $\text{Fe}^{3+}$ , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o  $\text{Fe}^{3+}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido com  $\text{Fe}^{2+}$  (ROGINSKY *et al.*, 2005). O poder redutor foi observado pela doação direta de elétrons na redução do ferricianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  a ferrocianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{Cn})_6]^{4-}$ . O produto foi visualizado pela adição de íons  $\text{Fe}^{3+}$ , que forma o complexo azul da Prússia,  $\text{Fe}_4 [\text{Fe}(\text{Cn})_6]^{3-}$ . O mesmo autor ainda cita que o método baseado na redução do  $\text{Fe}^{+3}$  também é utilizado para avaliação do potencial antioxidante. esse método é muito é considerado efetivo quando as substâncias apresentam compostos fenólicos. desta forma este teste é considerado tanto para quantificar fenóis totais, quanto para determinar a atividade antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos de baixo peso molecular são considerados substâncias de maior atividade antioxidante, pois além de possuírem a peculiaridade de quelar íons metálicos, o poder redutor decresce com o aumento do peso molecular (VANDERHAEGEN *et al.*, 2007). Numerosos estudos *in vitro* indicam que compostos fenólicos encontrados em plantas podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anti-carcinogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radical livres reativo e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (CERQUEIRA, 2007). A atividade antioxidante da maioria das plantas pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos. Estes tem capacidade de seqüestrar os radicais livres apresentando uma atividade antioxidante eficiente (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

#### 5.12.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TIOCIANATO

O efeito antioxidante dos extratos sobre a inibição da peroxidação do ácido linoléico foi avaliado por meio do método do Tiocianato Férrico. Neste ensaio, os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoléico reagem com o sulfato ferroso, dando origem ao sulfato férrico e, em seguida, ao tiocianato férrico, de cor vermelho sangue, que é monitorado espectrofotometricamente. Os peróxidos presentes oxidam o  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). O EEB e frações da espécie *A. extraaxilalis* demonstrou efeito antioxidante semelhante ao padrão BHT. Efeitos inibitórios mais intensos foram observados para a FH (97,64%) e FAE (97,94%) como demonstrado na figura 65.

Para a espécie *M. foetidus*, a inibição da oxidação também foi verificada. Todas as frações das folhas apresentaram potencial inibição na oxidação lipídica. Somente o EEB não apresentou efeito semelhante ao padrão BHT (47,17%). A FR (97,6%) apresentou maior percentual de inibição quando comparada as demais frações (figura 66). O EEB e frações das cascas apresentaram valores semelhantes ao BHT, com efeito mais acentuado para a FAE (97,46%) (figura 66). A FCL dos frutos não apresentou efeito inibitório semelhante ao BHT (68,61%). Ao contrário da FCL, o EEB e demais frações também atuaram na inibição da oxidação lipídica, com acentuado efeito para a FR (97,95%) (figura 65). Semelhante ao que foi observado nos outros métodos empregados, nossos resultados sugerem que ambas as espécies atuam na proteção contra a oxidação de lipídeos.

Extratos ou substâncias que apresentam potencial antioxidante são de extrema importância, principalmente quando avaliadas através de vários métodos, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^{+}$ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI; EBELER, 2008). Estes resultados demonstram a importância dos extratos e frações na prevenção quanto à oxidação de substâncias como membranas celulares.

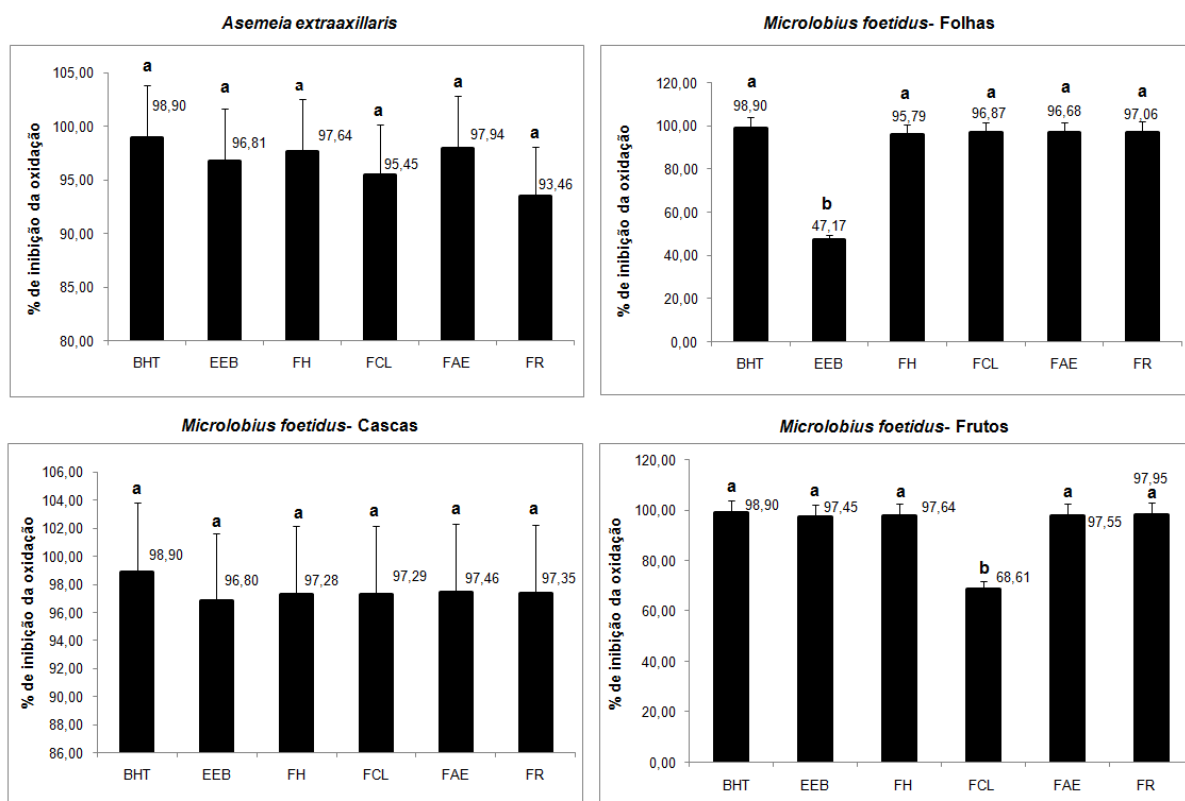


FIGURA 65. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO BHT, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) De *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DO TIOCIANATO. \*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

#### 5.12.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O método utilizado demonstrou atividade protetora dos extratos e frações contra a peroxidação lipídica. A FCL, FAE e FR da espécie *A. extraaxillaris* demonstrou efeito protetor semelhante ao padrão BHT. Efeitos inibitórios mais intensos foram observados para a FAE (92,76%) como demonstrado na figura 66. O EEB e frações das folhas, cascas e frutos também apresentaram potencial antioxidante frente a este método. Entretanto estes resultados não foram semelhantes aos padrões utilizados (Figura 66).

O estresse oxidativo resulta de reações metabólicas onde há um desequilíbrio entre pró-oxidante/antioxidante nos organismos, resultando em lesões teciduais por meio da peroxidação das membranas lipídicas de células e organelas, a desnaturação funcional de proteínas estruturais, lesões mutagênicas ou letais dos ácidos nucleicos e a desnaturação de componentes polissacarídeos de componentes do interstício de membranas basais, constituindo assim a via final da lesão tecidual em uma variedade de doenças (VANNUCCHI *et al.*, 1998).

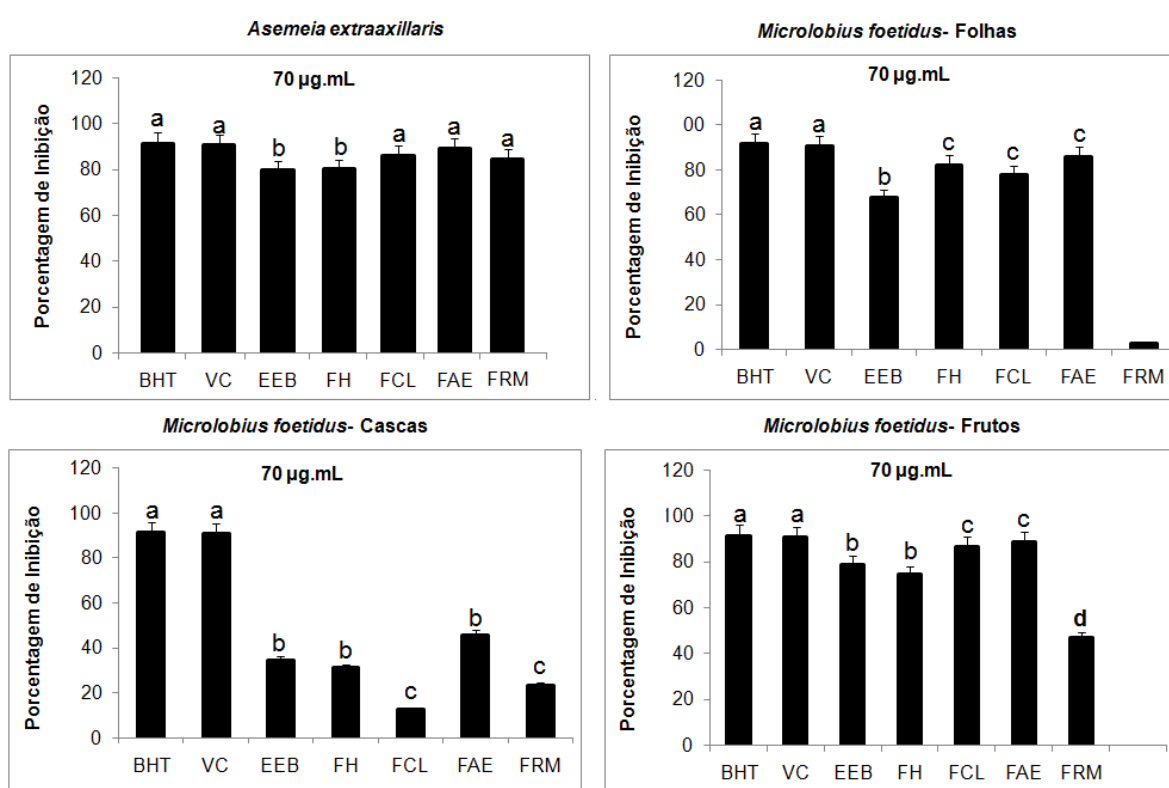


FIGURA 66. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.\*MEDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

No ensaio realizado o parâmetro analisado é a peroxidação de lipídeos presentes na gema do ovo, quantificando o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos formados durante a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)



durante o processo oxidativo. Envolve a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA, em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, gerando um cromóforo rosado medido espectrometricamente (DAWN-LINSLEY *et al.* 2005; KELLER *et al.* 2005). O ponto final é, portanto a mensuração do MDA permitindo avaliar a proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes das amostras. Nesta perspectiva, pode-se afirmar que os extratos e frações apresentam atividade antioxidante igual ao padrão BHT, ou seja, promove a mesma proteção, podendo ser um auxiliar na prevenção e combate aos danos celulares causados pela peroxidação lipídica. As outras amostras permitem proteção em menor intensidade quando comparadas ao padrão.

A atividade antioxidante de uma amostra sobre radicais livres depende de fatores determinados pela estrutura química das espécies envolvidas. Em reações *in vitro*, os parâmetros importantes são a reatividade química das moléculas presentes na amostra com a molécula do radical, e a estequiometria da reação (número de moléculas de radical que a amostra é capaz de neutralizar). Porém, em reações *in vivo*, além destes outros fatores estão envolvidos, que são determinados pelas taxas metabólicas de absorção, distribuição e retenção do fármaco nos tecidos, como a concentração e mobilidade da amostra no ambiente da reação e a interação com outros antioxidantes (WILLIAMS *et al.*, 1995; BONDET *et al.*, 1997; NIKI, 2010).

#### 5.12.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DA DESOXIRRIBOSE

O ensaio pelo método de redução da desoxirribose foi verificado que para a espécie *A. extraaxillaris* a FAE apresentou proteção contra a degradação semelhante à vitamina C, com 91,2% de inibição. Embora o EEB e demais frações apresentaram porcentagens inferiores ao padrão (figura 67), estes expressaram potencial antioxidante superior a 50%. Os mesmos resultados foram observados para as diferentes partes morfológicas de *M. foetidus*. Folhas e cascas não tiveram atividade semelhante ao padrão vitamina C (figura 67). Apenas a FAE das folhas foi

capaz de apresentar atividade antioxidante superior a 50%. O EEB (93,2%) e FAE (95,4%) dos frutos tiveram atividade antioxidante semelhante à vitamina C (figura 67).

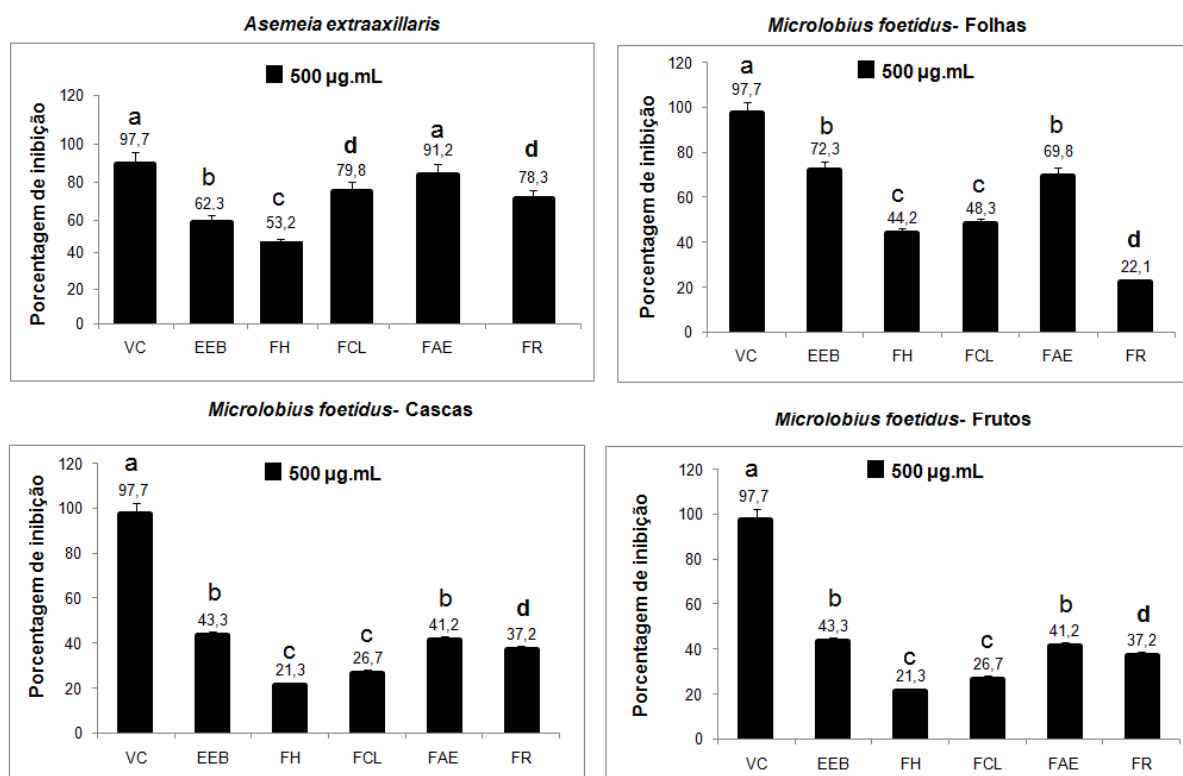


FIGURA 67. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DE REDUÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE.\*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ). VC: VITAMINA C.

O ensaio da desoxirribose mede a combinação de dois fatores: habilidade em remover íons ferro deste açúcar e habilidade em tornar tais íons inativos ou pobremente ativos na degradação de OH. As únicas substâncias que podem inibir o OH nesse tipo de ensaio são aquelas que se ligam a íons ferro o suficiente para retirá-los da desoxirribose (HALLIWELL *et al.*, 1995). O radical hidroxil causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose.

O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio (1-3) e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (HALLIWELL, 1999; HALLIWELL, 2008).

O açúcar desoxirribose é degradado quando exposto ao radical hidroxil, gerado pela mistura de  $\text{Fe}^{3+}$ , ascorbato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de uma pequena quantidade de EDTA. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, forma-se malondialdeído (MDA), que pode ser detectado por sua habilidade em reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo róseo. Qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com OH poderá competir com a desoxirribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e a formação de MDA (HALLIWELL *et al.*, 1987), tal como demonstrado neste trabalho.

#### 5.12.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DO $\text{H}_2\text{O}_2$

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método seqüestro do peróxido de hidrogênio foi observado que os extratos e frações de *A. extraaxillaris* não apresentaram atividade semelhante ao padrão vitamina C. Entretanto, o EEB, FAE e FR apresentaram atividade seqüestradora acima de 50% (65,3%; 67,3% e 55,2% respectivamente) (figura 68). Efeito similar foi observado para os extratos e frações das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus*. Atividade antioxidante superior ou igual a 50% foi observado para o EEB (65,2%; 71,2%; 89,3%) e FAE (58,3%; 63,2%; 93,2%) das folhas, cascas e frutos, respectivamente (figura 68).

Embora o peróxido de hidrogênio não é um radical livre, está envolvido de forma direta ou indireta em diversas patologias. Em termos químicos,  $\text{H}_2\text{O}_2$  é fracamente reativo, no entanto exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) (ARUOMA *et al.*, 1989).

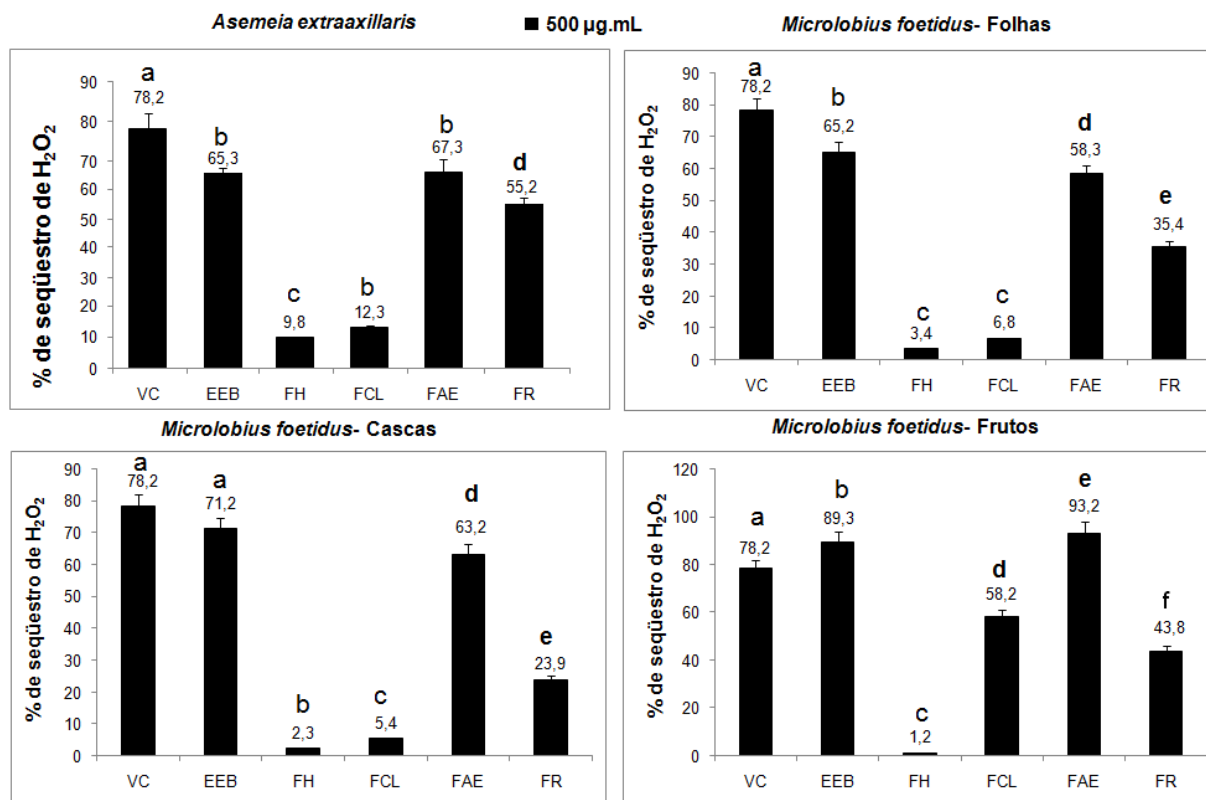


FIGURA 68. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*, FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus* PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE DUNNET (P < 0.05). VC: VITAMINA C.

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub>•) ou é produzido por enzimas oxidases e pela oxidação de ácidos graxos. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atuar como agente oxidante ou redutor leve, mas não oxida a maioria das moléculas orgânicas facilmente, incluindo lipídios, DNA e proteínas (com exceção de proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, a exemplo da glutathiona (GSH)). O efeito deletério do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vem de sua fácil conversão para um radical hidroxil, por exposição à luz ultravioleta ou por interação com metais de transição como o ferro (BARREIROS *et al.*, 2006).

Pode atravessar as membranas celulares rapidamente e uma vez dentro da célula, o peróxido de hidrogênio pode reagir com os íons Fe<sub>2</sub><sup>+</sup> para formar radical hidroxila que pode causar efeitos tóxicos. Portanto é biologicamente vantajoso para

as células controlar a quantidade de peróxido de hidrogênio (NAGULENDRAN; MAHESH; BEGUM, 2007). Dessa forma, as frações com 50% de atividade antioxidante mostraram-se promissoras no estudo de atividade antioxidante, no seqüestro de  $H_2O_2$ .

#### 5.12.8 RELAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES MÉTODOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os testes *in vitro* têm se tornado importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. Devido à crescente busca por substâncias bioativas que substituam os produtos sintéticos e diminuam os efeitos colaterais, um grande número de testes *in vitro* tem sido desenvolvido para avaliar a atividade antioxidante, porém muitos desses métodos não têm demonstrado correlação com a habilidade dos compostos em inibir a deterioração oxidativa *in vivo* (ALVES et al., 2010).

Isto se deve ao fato de que a atividade antioxidante depende não somente da reatividade química do antioxidante, mas também de fatores como localização física, interação com outros componentes e condições ambientais. Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto. Para uma avaliação correta desta atividade em alimentos e sistemas biológicos, modelos individuais devem ser desenvolvidos desde que representem as mesmas condições químicas, físicas e ambientais esperadas para o sistema em análise (TAKEMOTO et al., 2009).

Segundo ALVES et al., 2010, para os diversos tipos de radicais e diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto. Dessa forma, o uso de diferentes métodos tornou possível estabelecer o tipo de atividade antioxidante para cada extrato e fração avaliado. Analisando os resultados obtidos a partir das sete metodologias observa-se em comum a atividade antioxidante da

fração acetato de etila (FAE) similar aos padrões utilizados em um número maior de ensaios. Sabe-se que flavonóides são um grupo de metabólitos majoritariamente encontrados na fração acetato de etila (FALKENBERG *et al.* 2004). Assim, sugere-se que a ação antioxidante observada nos ensaios esteja relacionada a esta classe de substâncias.

Com relação aos métodos de atividade antioxidante avaliados, constata-se que todos confirmam o potencial antioxidante dos extratos em testes *in vitro*. O Método do DPPH é simples e amplamente empregado, onde o DPPH é um radical livre estável, não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxil, alcoxil e superóxido, que apresentam um importante papel nos processos oxidativos biológicos. Várias séries de compostos químicos têm apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradora de DPPH e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não-biológicos (MALTERUD *et al.*, 1993; YAMAZAKI *et al.* 1994). Logo, o ensaio de atividade seqüestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante e pode ser empregado para *screening* de compostos químicos sintéticos e produtos naturais, tornando-se importante como teste preliminar para a determinação do potencial antioxidante de um extrato e/ou fração, ou ainda substância pura.

Assim, o emprego de testes de atividade como o fosfomolibdênio torna-se necessário para estabelecer a ação da substância testada. No teste antioxidante pelo fosfomolibdênio, os resultados indicam que a FAE, por reduzir o do molibdênio VI a molibdênio V pode inibir a ação da xantina oxidase, uma vez que o molibdênio é utilizado como cofator desta enzima. A xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico que, em ambiente fisiológico, está na forma de urato. A hipoxantina e a xantina são muito mais solúveis que o ácido úrico, e este último pode se depositar como urato de sódio, um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença conhecida como gota (TSUTOMU *et al.*, 1991). Dessa forma, extratos e frações que apresentaram atividade antioxidante por este método podem ter sua atividade investigada no tratamento da doença de gota.

A formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no organismo podendo liberar elétrons em processos oxidativos levando à peroxidação lipídica de membranas, que

pode levar as células à apoptose e também estar associados a doenças neuro degenerativas como Alzheimer e Parkinson (SMITH *et al.*, 1997; GIASSON *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002; WESTPHAL; KALTHOFF, 2003). VAN HOORN *et al.*, (2002) testaram uma série de flavonóides de diferentes classes, e verificaram a inibição sobre a xantina oxidase. Diante destes resultados verifica-se que a classe dos flavonóides podem ser consideradas alvos potenciais e interessantes para inativação da xantina oxidase.

O ensaio do poder redutor torna possível confirmar a atividade antioxidante do método frente ao DPPH. O teste do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do  $\text{FeCl}_3$ ), forma o azul da Prússia. Os métodos baseados na redução do  $\text{Fe}^{+3}$ , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o  $\text{Fe}^{+3}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido com  $\text{Fe}^{+2}$  (ROGINSKY; LISSI, 2005). Dessa forma, torna-se importante quantificar compostos fenólicos presentes em extratos e frações, com a finalidade de correlacionar com resultados obtidos para a atividade antioxidante frente ao poder redutor.

A avaliação da inibição da oxidação lipídica pelo método do Tiocianato sustenta os dados observados para o método da Peroxidação lipídica. Estes ensaios demonstram que os extratos e frações que apresentaram atividade fornecem proteção contra espécies que atacam as membranas celulares causando peroxidação lipídica, o que acarreta aumento da permeabilidade celular com a entrada de cálcio, saída de citocromo C das mitocôndrias e ativação da esfingomielienase, todos processos que ativam as cascatas de capazes, proteínas sinalizadoras de morte celular (HENSLEY *et al.*, 2000; PATEL *et al.*, 2001).

Espécies reativas de oxigênio atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos e do colesterol, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez, podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados propagando a reação. O resultado de tal processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica tem vida curta e quando reagem

com metais, aldeídos (malondialdeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e causam novos danos ao DNA (SOUSA *et al.*, 2004).

Os ensaios de inibição da peroxidação lipídica tornam-se importantes, uma vez que complementam os resultados obtidos para a inibição na degradação da desoxirribose. Neste ensaio, o radical hidroxil é gerado quando um quelato de  $\text{Fe}^{+3}/\text{EDTA}$  é incubado com desoxirribose em tampão fosfato. Os radicais que não são sequestrados pelo EDTA atacam a desoxirribose e iniciam uma série de reações que originam a formação de MDA. Os produtos da degradação da desoxirribose quando aquecidos com ácido tiobarbitúrico, em pH baixo, formam um cromóforo rosa, que pode ser detectado em espectrofotômetro em 535 nm (ARUOMA, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Os resultados obtidos para a inibição da desoxirribose apontam que os extratos com atividade devem ser investigados na prevenção contra danos ao DNA, além da capacidade de redução do  $\text{Fe}^{3+}$ . Resultados obtidos no seqüestro do  $\text{H}_2\text{O}_2$  demonstram que este método também pode ser investigado para uma triagem de extratos e frações com a finalidade de diminuir a quantidade de radicais hidroxil nos sistemas biológicos.

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido ou é produzido por enzimas oxidases e pela oxidação de ácidos graxos.  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar como agente oxidante ou redutor leve, mas não oxida a maioria das moléculas orgânicas facilmente, incluindo lipídios, DNA e proteínas (com exceção de proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, a exemplo da glutathiona (GSH)). O efeito deletério do  $\text{H}_2\text{O}_2$  vem de sua fácil conversão para um radical hidroxil, por exposição à luz ultravioleta ou por interação com metais de transição como o ferro, através da reação conhecida como reação de Fenton (BARREIROS *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível traçar um fluxograma para investigações antioxidantes e sua aplicação em testes *in vitro* ou tratamento de doenças (figura 69). A relação entre a função antioxidante pode auxiliar na escolha de testes *in vivo*, além do direcionamento em estudos com substâncias isoladas.



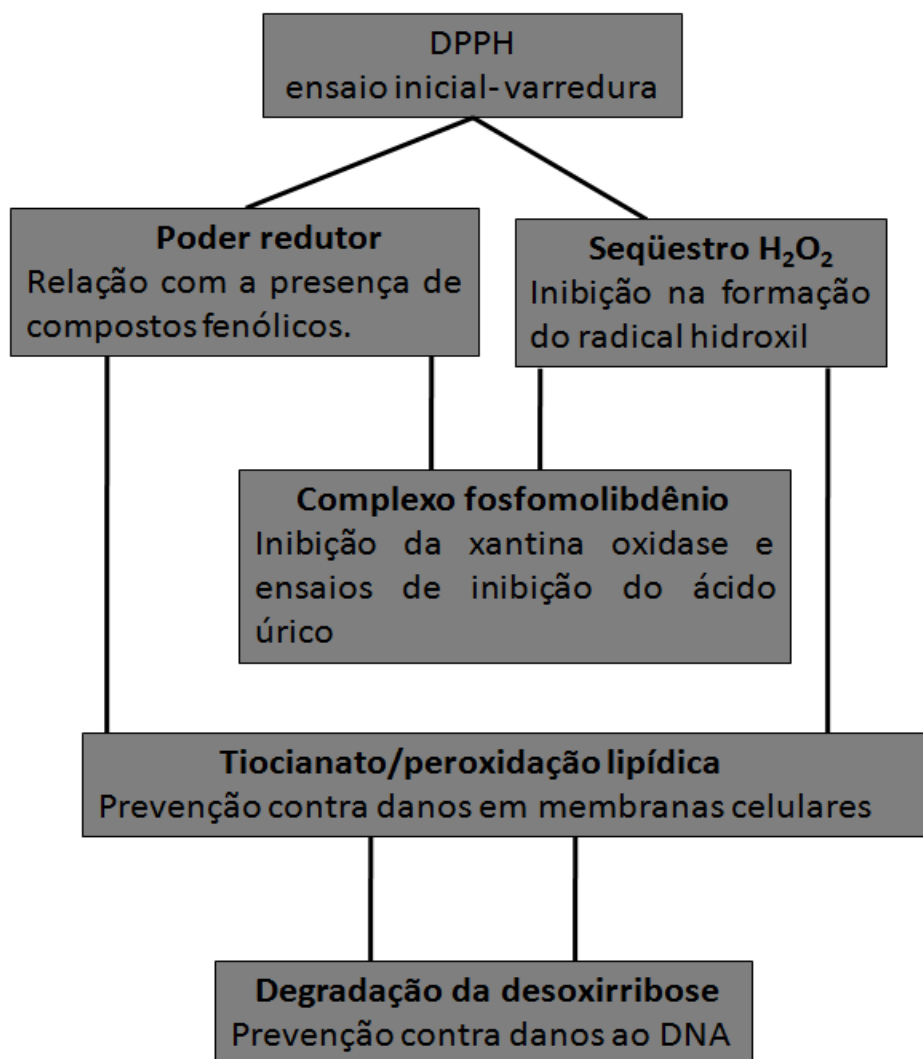


FIGURA 69. RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O TIPO DE PREVENÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Além disso, a capacidade em inibir ou prevenir danos oxidativos está associada com o tratamento e prevenção de doenças, como por exemplo, de origem inflamatória e degenerativa. Entretanto, não é possível extrapolar os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante para reações que ocorrem em organismos vivos, pois se tratam de reações químicas realizadas *in vitro*, e dessa forma, testes *in vivo* são necessários para estabelecer o perfil da atividade antioxidante das amostras utilizadas em sistemas vivos.

### 5.13 REDUÇÕES NO NÚMERO DE ABERRAÇÕES PROVOCADOS PELO HERBICIDA ATRAZINA

Após 24 e 48 horas de exposição ao herbicida atrazina, efeitos clastogênicos foram observados em células de *A. cepa*. O número de aberrações cromossômicas induzidas pelo herbicida atrazina foram maiores em células submetidas a 48 horas. O aumento significativo no número de aberrações cromossômicas foi caracterizado por um grande aumento no número de anáfase multipolar, bem como perda de filamentos cromossômicos (tabela 35). Quando observamos os tipos de aberrações celulares, a frequência de fragmentos induzidos pelo herbicida atrazina após 24 e 48 horas de exposição foram reduzidos significativamente pela quercetina, bem como pelos extratos e frações de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*.

Ao compararmos os efeitos clastogênicos, observa-se que todas as concentrações de quercetina reduziram o número de aberrações, sendo verificado um efeito protetor mais acentuado após 48 horas de tratamento com reduções na C-mitose (0,36), aderência cromossômica (0,27) e anáfase multipolar (0,46) (tabela 55). Assim como observado para o padrão quercetina, *A. extraaxillaris* diminuiu o número de aberrações após 24 e 48 horas de tratamento em todas as concentrações ensaiadas, com reduções acentuadas na ação do herbicida atrazina para a concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Reduções para as aberrações como C-metáfase (1,89), célula poliplóide (1,66) e aderência cromossômica (1,34) foram as mais reduzidas após 48 horas de exposição (tabela 35).

A FAE das diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* também apresentaram efeito protetor contra os efeitos clastogênicos do herbicida atrazina. De maneira similar ao observado em *A. extraaxillaris*, a maior concentração utilizada após 48 de exposição foi mais efetiva na proteção destes efeitos. C-metáfase (0,6), aderência cromossômica (1,7) e pontes cromossômicas (1,5) foram reduzidas após tratamento com a FAE das folhas (tabela 27) e os mesmos efeitos podem ser observados para células tratadas com a FAE das cascas, com reduções também observadas para a C-metáfase (0,6), aderência cromossômica (1,2) também foram observadas. Alterações no número de alterações como anáfase multipolar (1,1) também foram observadas para a FAE das cascas após 48 horas de exposição (tabela 36).

Os frutos de *M. foetidus* apresentaram efeito protetor contra alterações celulares provocadas pelo herbicida. Como observado nas folhas e cascas, efeitos inibitórios mais intensos foram observados para C- metáfase (0,3), célula poliplóide (0,2), aderência cromossômica (0,1), ponte cromossômica (0,1), anáfase multipolar (0,1), célula polinucleada (0,1) e perda cromossômica (0,1) (tabela 36, figura 70).

TABELA 35. FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CELULARES EM MERISTEMAS DE *A. cepa*, SUBMETIDAS AO HERBICIDA ATRAZINA, E TRATADAS COM O PADRÃO QUERCETINA E A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DE *A. extraaxillaris* DURANTE 24 E 48 H DE RECUPERAÇÃO PÓS-TRATAMENTO.

Tipo de alteração	Quercetina									
	Controle água		Atrazina (2 µg/mL)		2,5 µ/mL		5,0 µ/mL		10 µ/mL	
	24	24	24	48	24	48	24	48	24	48
C-M	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,78±1,75 <sup>b</sup>	7,36±1,29 <sup>b</sup>	3,33±1,25 <sup>b</sup>	2,12±1,78 <sup>b</sup>	1,19±1,01 <sup>b</sup>	1,28±1,05 <sup>b</sup>	0,87±1,08 <sup>b</sup>	0,36±0,25 <sup>b</sup>
PP	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±2,33 <sup>b</sup>	18,26±1,22 <sup>b</sup>	3,76±1,29 <sup>b</sup>	2,62±1,67 <sup>b</sup>	1,87±1,09 <sup>b</sup>	1,03±1,09	0,67±1,02 <sup>b</sup>	0,45±0,09 <sup>b</sup>
CA	0,30±0,17 <sup>a</sup>	0,30±0,17 <sup>a</sup>	7,89±1,24 <sup>b</sup>	16,21±1,28 <sup>b</sup>	4,26±1,09 <sup>b</sup>	3,21±0,89 <sup>b</sup>	1,78±1,02 <sup>b</sup>	1,07±1,00 <sup>b</sup>	0,98±0,08 <sup>b</sup>	0,27±0,07 <sup>b</sup>
PC	0,0±0,00 <sup>a</sup>	0,0±0,00 <sup>a</sup>	8,50±1,16 <sup>b</sup>	17,56±1,91 <sup>b</sup>	3,87±1,27 <sup>b</sup>	2,21±1,33 <sup>b</sup>	1,25±1,08 <sup>b</sup>	1,21±1,06 <sup>b</sup>	1,17±0,09 <sup>b</sup>	0,45±0,08 <sup>b</sup>
AM	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	12,62±2,12 <sup>b</sup>	26,15±1,28 <sup>b</sup>	3,56±0,92 <sup>b</sup>	3,12±1,26 <sup>b</sup>	1,78±1,09 <sup>b</sup>	1,71±1,07 <sup>b</sup>	1,44±1,02 <sup>b</sup>	0,46±1,08 <sup>b</sup>
PC	0,57±0,33 <sup>a</sup>	0,57±0,33 <sup>a</sup>	8,78±1,15 <sup>b</sup>	17,26±1,92 <sup>b</sup>	3,78±1,01 <sup>b</sup>	3,67±1,26 <sup>b</sup>	1,57±1,02 <sup>b</sup>	1,33±1,08 <sup>b</sup>	1,46±1,08 <sup>b</sup>	1,98±1,06 <sup>b</sup>
CL	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,75±1,22 <sup>b</sup>	20,12±1,25 <sup>b</sup>	3,67±1,02 <sup>b</sup>	3,55±1,08 <sup>b</sup>	2,28±1,09 <sup>b</sup>	1,48±1,02 <sup>b</sup>	2,33±1,09 <sup>b</sup>	1,78±1,01 <sup>b</sup>
Tipo de alteração	FAE- <i>A. extraaxillaris</i>									
	Controle água		Atrazina (2 µg/mL)		125 µg/mL		250 µg/mL		500µg/mL	
	24	24	24	48	24	48	24	48	24	48
C-M	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,78±1,75 <sup>b</sup>	7,36±1,29 <sup>b</sup>	4,62±2,33 <sup>b</sup>	3,67±1,22 <sup>b</sup>	3,27±1,05 <sup>b</sup>	2,40±1,06 <sup>b</sup>	2,22±1,04 <sup>b</sup>	1,89±1,01 <sup>b</sup>
CP	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±2,33 <sup>b</sup>	18,26±1,22 <sup>b</sup>	9,88±1,31 <sup>b</sup>	8,99±1,54 <sup>b</sup>	7,21±1,04 <sup>b</sup>	6,73±1,03 <sup>b</sup>	2,67±1,03 <sup>b</sup>	1,66±1,06 <sup>b</sup>
AC	0,30±0,17 <sup>a</sup>	0,30±0,17 <sup>a</sup>	7,89±1,24 <sup>b</sup>	16,21±1,28 <sup>b</sup>	7,98±1,54 <sup>b</sup>	6,72±1,16 <sup>b</sup>	5,15±1,07 <sup>b</sup>	4,82±1,02 <sup>b</sup>	2,76±1,09 <sup>b</sup>	1,34±1,02 <sup>b</sup>
PC	0,0±0,00 <sup>a</sup>	0,0±0,00 <sup>a</sup>	8,50±1,16 <sup>b</sup>	17,56±1,91 <sup>b</sup>	10,29±1,5 <sup>b</sup>	7,89±1,22 <sup>b</sup>	5,43±1,01 <sup>b</sup>	4,89±1,03 <sup>b</sup>	2,31±1,07 <sup>b</sup>	1,89±1,06 <sup>b</sup>
AM	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	2,62±2,12 <sup>b</sup>	26,15±1,28 <sup>b</sup>	10,98±1,1 <sup>b</sup>	10,2±1,26 <sup>b</sup>	6,59±1,05 <sup>b</sup>	5,23±1,06 <sup>b</sup>	3,44±0,67 <sup>b</sup>	2,37±1,06 <sup>b</sup>
CP	0,57±0,33 <sup>a</sup>	0,57±0,33 <sup>a</sup>	8,78±1,15 <sup>b</sup>	17,26±1,92 <sup>b</sup>	10,22±1,24 <sup>b</sup>	6,34±1,68 <sup>b</sup>	5,49±1,07 <sup>b</sup>	5,12±1,03 <sup>b</sup>	3,67±1,06 <sup>b</sup>	2,18±1,03 <sup>b</sup>
PC	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,75±1,22 <sup>b</sup>	20,12±1,25 <sup>b</sup>	10,89±1,6 <sup>b</sup>	8,67±1,26 <sup>b</sup>	7,88±1,03 <sup>b</sup>	6,33±1,03 <sup>b</sup>	4,26±1,06 <sup>b</sup>	2,55±1,06 <sup>b</sup>

NOTA: MÉDIA + DESVIO PADRÃO. C- METÁFASE (C-M), CÉLULA POLIPLÓIDE (CP), ADERÊNCIA CROMOSSÔMICA (AC), PONTE CROMOSSÔMICA (PC), ANÁFASE MULTIPOLAR (AM), CÉLULA POLINUCLEADA (CP), PERDA CROMOSSÔMICA (PC). <sup>1</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

TABELA 36. FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CELULARES EM MERISTEMAS DE *A. cepa*, SUBMETIDAS AO HERBICIDA ATRAZINA, E TRATADAS COM O PADRÃO QUERCETINA E A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus* DURANTE 24 E 48 H DE RECUPERAÇÃO PÓS-TRATAMENTO.

FOLHAS										
Tipo de alteração	Controle água		Atrazina (2 µg.mL)		125 µg.mL		250 µg.mL		500 µg.mL	
	24	24	24	48	24	48	24	48	24	48
C-M	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,78±1,75 <sup>b</sup>	7,36±1,29 <sup>b</sup>	3,33±1,25 <sup>b</sup>	2,12±1,78 <sup>b</sup>	2,12±0,22 <sup>b</sup>	1,2±0,17 <sup>b</sup>	1,87±1,28 <sup>b</sup>	0,6±0,25 <sup>b</sup>
CP	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±2,33 <sup>b</sup>	18,2±1,22 <sup>b</sup>	9,76±1,29 <sup>b</sup>	7,62±1,67 <sup>b</sup>	6,55±1,62 <sup>b</sup>	4,2±0,67 <sup>b</sup>	2,67±1,92 <sup>b</sup>	3,5±0,89 <sup>b</sup>
AC	0,30±0,17 <sup>a</sup>	0,30±0,17 <sup>a</sup>	7,89±1,24 <sup>b</sup>	16,1±1,28 <sup>b</sup>	8,26±1,09 <sup>b</sup>	5,21±0,89 <sup>b</sup>	7,28±1,12 <sup>b</sup>	3,8±0,22 <sup>b</sup>	1,98±0,78 <sup>b</sup>	1,7±0,17 <sup>b</sup>
PC	0,0±0,00 <sup>a</sup>	0,0±0,00 <sup>a</sup>	8,50±1,16 <sup>b</sup>	17,5±1,91 <sup>b</sup>	10,7±1,27 <sup>b</sup>	6,21±1,33 <sup>b</sup>	8,72±0,89 <sup>b</sup>	6,5±1,43 <sup>b</sup>	1,67±0,81 <sup>b</sup>	1,5±0,78 <sup>b</sup>
AM	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	12,6±2,12 <sup>b</sup>	26,8±1,28 <sup>b</sup>	12,6±0,92 <sup>b</sup>	10,1±1,26 <sup>b</sup>	7,62±0,67 <sup>b</sup>	5,3±1,21 <sup>b</sup>	2,4±1,22 <sup>b</sup>	3,6±1,28 <sup>b</sup>
CP	0,57±0,33 <sup>a</sup>	0,57±0,33 <sup>a</sup>	8,78±1,15 <sup>b</sup>	17,4±1,92 <sup>b</sup>	9,78±1,01 <sup>b</sup>	6,67±1,26 <sup>b</sup>	7,68±0,56 <sup>b</sup>	4,9±1,23 <sup>b</sup>	3,46±1,98 <sup>b</sup>	1,8±1,26 <sup>b</sup>
PC	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,75±1,22 <sup>b</sup>	20,4±1,25 <sup>b</sup>	12,7±1,92 <sup>b</sup>	7,55±1,08 <sup>b</sup>	6,23±1,15 <sup>b</sup>	5,4±1,12 <sup>b</sup>	4,33±1,29 <sup>b</sup>	1,8±1,11 <sup>b</sup>
CASCAS										
Tipo de alteração	Controle água		Atrazina (2 µg.mL)		125 µg.mL		250 µg.mL		500 µg.mL	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
C-M	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,78±1,75 <sup>b</sup>	7,36±1,29 <sup>b</sup>	4,13±1,44 <sup>b</sup>	3,27±1,12 <sup>b</sup>	2,19±1,01 <sup>b</sup>	1,2±1,05 <sup>b</sup>	1,3±0,55 <sup>b</sup>	0,6±0,12 <sup>a</sup>
CP	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±2,33 <sup>b</sup>	18,2±1,22 <sup>b</sup>	10,2±1,66 <sup>b</sup>	8,72±1,12 <sup>b</sup>	4,87±1,09 <sup>b</sup>	6,3±1,29 <sup>b</sup>	2,2±0,23 <sup>b</sup>	1,8±0,92 <sup>b</sup>
AC	0,30±0,07 <sup>a</sup>	0,30±0,07 <sup>a</sup>	7,89±1,24 <sup>b</sup>	16,1±1,28 <sup>b</sup>	10,7±1,16 <sup>b</sup>	8,72±1,19 <sup>b</sup>	5,78±1,92 <sup>b</sup>	4,7±1,28 <sup>b</sup>	1,9±1,17 <sup>b</sup>	1,2±0,56 <sup>b</sup>
PC	0,0±0,00 <sup>a</sup>	0,0±0,00 <sup>a</sup>	8,50±1,16 <sup>b</sup>	17,6±1,91 <sup>b</sup>	10,2±1,65 <sup>b</sup>	8,33±1,45 <sup>b</sup>	6,25±1,78 <sup>b</sup>	4,1±1,16 <sup>b</sup>	3,2±1,10 <sup>b</sup>	2,1±1,09 <sup>b</sup>
AM	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	12,6±2,12 <sup>b</sup>	26,5±1,28 <sup>b</sup>	12,3±1,67 <sup>b</sup>	8,72±1,16 <sup>b</sup>	7,78±1,29 <sup>b</sup>	9,1±1,67 <sup>b</sup>	2,2±1,54 <sup>b</sup>	1,1±1,54 <sup>b</sup>
CP	0,57±0,03 <sup>a</sup>	0,57±0,03 <sup>a</sup>	8,78±1,15 <sup>b</sup>	17,6±1,92 <sup>b</sup>	10,8±1,12 <sup>b</sup>	9,22±1,12 <sup>b</sup>	6,57±1,92 <sup>b</sup>	4,3±1,28 <sup>b</sup>	2,1±1,04 <sup>b</sup>	1,9±0,23 <sup>b</sup>
PC	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,75±1,22 <sup>b</sup>	20,2±1,25 <sup>b</sup>	10,2±1,00 <sup>b</sup>	8,72±1,23 <sup>b</sup>	10,2±1,89 <sup>b</sup>	5,8±1,02 <sup>b</sup>	2,3±1,10 <sup>b</sup>	1,4±0,28 <sup>b</sup>
FRUTOS										
Tipo de alteração	Controle água		Atrazina (2 µg.mL)		125 µg.mL		250 µg.mL		500 µg.mL	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
C-M	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,78±1,75 <sup>b</sup>	7,36±1,09 <sup>b</sup>	1,12±0,03 <sup>b</sup>	0,56±0,07 <sup>b</sup>	0,35±0,03 <sup>a</sup>	0,4±0,04 <sup>a</sup>	0,21±0,04 <sup>a</sup>	0,3±0,01 <sup>a</sup>
CP	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±2,33 <sup>b</sup>	18,6±1,02 <sup>b</sup>	2,78±1,06 <sup>b</sup>	2,23±0,06 <sup>b</sup>	1,22±0,07 <sup>b</sup>	0,3±0,05 <sup>a</sup>	0,29±0,04 <sup>a</sup>	0,2±0,06 <sup>a</sup>
AC	0,30±0,07 <sup>a</sup>	0,30±0,17 <sup>a</sup>	7,89±1,24 <sup>b</sup>	16,1±1,28 <sup>b</sup>	2,21±0,06 <sup>b</sup>	1,67±0,02 <sup>b</sup>	0,63±0,07 <sup>a</sup>	0,6±0,08 <sup>a</sup>	0,11±0,04 <sup>a</sup>	0,1±0,06 <sup>a</sup>
PC	0,0±0,00 <sup>a</sup>	0,0±0,00 <sup>a</sup>	8,50±1,16 <sup>b</sup>	17,5±1,91 <sup>b</sup>	3,89±0,09 <sup>b</sup>	1,89±0,08 <sup>b</sup>	0,88±0,04 <sup>b</sup>	0,8±0,06 <sup>a</sup>	0,12±0,09 <sup>a</sup>	0,1±0,03 <sup>a</sup>
AM	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	12,2±2,12 <sup>b</sup>	26,1±1,28 <sup>b</sup>	3,28±0,04 <sup>b</sup>	1,71±0,02 <sup>b</sup>	0,73±0,05 <sup>a</sup>	0,8±0,03 <sup>a</sup>	0,2±0,05 <sup>a</sup>	0,1±0,05 <sup>a</sup>
CP	0,57±0,03 <sup>a</sup>	0,57±0,03 <sup>a</sup>	8,78±1,15 <sup>b</sup>	17,2±1,92 <sup>b</sup>	3,45±0,09 <sup>b</sup>	1,22±0,09 <sup>b</sup>	0,89±0,07 <sup>b</sup>	0,8±0,06 <sup>a</sup>	0,2±0,08 <sup>a</sup>	0,1±0,05 <sup>a</sup>
PC	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	9,75±1,22 <sup>b</sup>	20,1±1,25 <sup>b</sup>	2,87±0,08 <sup>b</sup>	1,72±0,02 <sup>b</sup>	0,54±0,05 <sup>a</sup>	0,9±0,00 <sup>a</sup>	0,3±0,06 <sup>a</sup>	0,1±0,07 <sup>a</sup>

NOTA: MÉDIA + DESVIO PADRÃO. C- METÁFASE (C-M), CÉLULA POLIPLÓIDE (CP), ADERÊNCIA CROMOSSÔMICA (AC), PONTE CROMOSSÔMICA (PC), ANÁFASE MULTIPOLAR (AM), CÉLULA POLINUCLEADA (CP), PERDA CROMOSSÔMICA (PC). <sup>a</sup>MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE DUNNET. <sup>NS</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE DA MÉDIA DO CONTROLE.

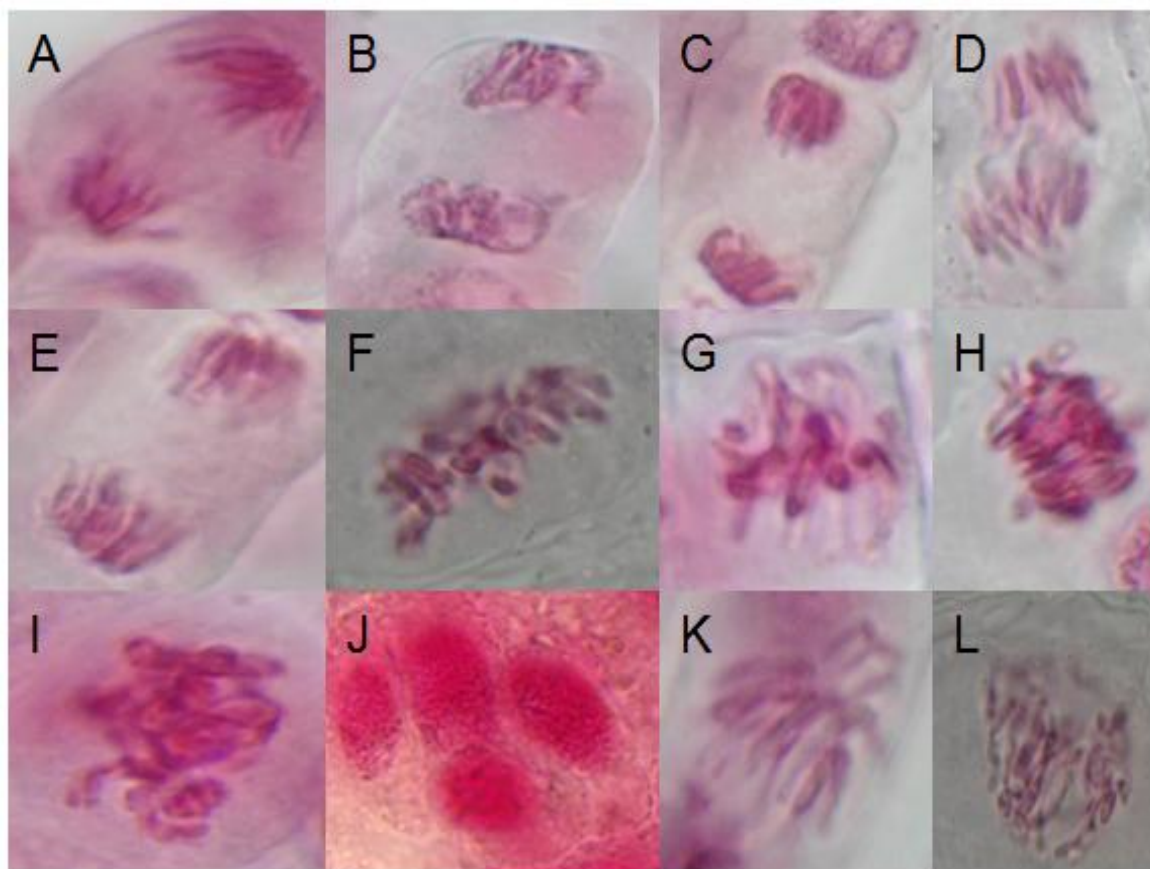


FIGURA 70. ABERRAÇÕES INDUZIDAS PELO USO DO HERBICIDA ATRAZINA EM MERISTEMAS DE *A. cepa*. ANÁFASE NORMAL (A, B, C, E), ANÁFASE COM PERDA CROMOSSÔMICA (D), METÁFASE COM ADERÊNCIA (F, G, H, I, K), CÉLULA POLINUCLEADA, PERTURBAÇÃO DO EIXO NA PRÓFASE RETARDADA.

As alterações cromossômicas constituem uma fração relevante de danos causados por agentes físicos, químicos e biológicos ao material genético. Muitos compostos capazes de causar mutações gênicas também causam mutações cromossômicas. Entretanto, algumas substâncias atuam apenas ao nível cromossômico, não sendo, portanto, detectadas pelos testes que usam bactérias como sistema indicador. Assim, é imprescindível a inclusão dos testes citogenéticos na avaliação do potencial mutagênico de um composto (MORAES, 2001).

Os tipos de alterações cromossômicas mais freqüentes podem ser assim definidos: C-metáfase é descrita quando a formação do fuso foi prejudicada (EL-

GHAMERY *et al.*, 2000), o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e que a divisão do centrômero é atrasada. No entanto, ela pode ser reversível, o que indica um fraco efeito tóxico (ODEGAH *et al.*, 1997).

Metáfase desorganizada é a disposição difusa dos cromossomos no plano equatorial da célula. Esta alteração é considerada sinal de malformação ou inativação parcial do fuso, todavia, pouco se sabe sobre como as atividades do fuso são diretamente reguladas (MARCANO *et al.*, 2004).

A ocorrência de migrações precoces ou tardias, provavelmente, está relacionada a algum tipo de alteração ocorrida nos microtúbulos do fuso, uma vez que, por definição, estas estruturas são responsáveis em manter, por curto período de tempo, os cromossomos na região equatorial da célula.

Nas condições experimentais, quercetina, por si só não é clastogênica e não aumenta essa atividade após o tratamento com atrazina, com efeito protetor acentuado para as concentrações do herbicida utilizadas neste ensaio. Estes resultados também demonstram uma relação de dose- dependência. Johnson e Loo (2000); Lautraite e Colaboradores (2002) relatou que 10  $\mu\text{M}$  de quercetina protege células contra danos oxidativos ao DNA e inibe a toxicidade genética produzida por agentes cancerígenos, no entanto, tanto quanto sabemos, não são poucos os relatos onde a atividade genotóxica da quercetina foi avaliada em concentrações mais baixas.

É importante notar que baixas doses de quercetina são capazes de induzir uma resposta adaptativa para desafiar doses de substâncias mutagênicas, enquanto doses mais elevadas podem ser genotóxicas (SPENCER *et al.*, 2003). Também deve ser notado que a concentração de 5,0  $\mu\text{g.mL}$  de quercetina utilizado neste estudo é comparável à concentração de quercetina consumida na dieta humana em seres humanos (MIDDLETON *et al.*, 2000).

Tal como observado para o padrão quercetina, a FAE de *A. extraaxillaris*, folhas, cascas e frutos de *M. foetidus* possuem substâncias químicas que protegem células contra efeitos clastogênicos, sendo que esta ação pode estar relacionada a presença de flavonóides nestas frações. Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na atividade protetora do EEB e frações. A literatura relata que flavonóides possuem atividade apoptótica em hepatoma humano (RAMOS *et al.*, 2005). Além disso, LIOI *et al.*, (1998), em estudos de aberrações em linfócitos

humanos induzidos por atrazina, detectou um aumento na atividade da glicose intracelular 6-fosfato desidrogenase ( $G_6PD$ ), o que foi interpretado como parte de uma reação defensiva das células induzidas pelo herbicida atrazina.

Abel e Colaboradores (2004) relataram que atrazina é biotransformado nas células hepáticas por humanos e cobaias, pela ação da GS S-transferase e, muito provavelmente este mecanismo é o mesmo em plantas. A quercetina poderia agir regenerando a GSH, tal como relatado por Boadi e Colaboradores (2005) para as linhas de células humanas. Os flavonóides aumentam o nível intracelular de GSH por transativação do  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase (GCS), sendo que este efeito pode ser exercido, em parte, através da regulação de genes GCS, e também podem contribuir para os efeitos de prevenção de doenças (MYHRSTAD *et al.*, 2002).

Os flavonóides exercem efeitos benéficos em diversos estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e em desordens neuro vegetativas. Muitas ações biológicas destes compostos são atribuídas às suas propriedades antioxidantes, e à sua possível influência do estado *redox* intracelular. O mecanismo preciso exercido pelos flavonóides destas ações benéficas e tóxicas ainda permanece pouco conhecido. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado sua atividade antioxidante clássica de doação de hidrogênio (RICE-EVANS *et al.*, 1996, 1997; RICE-EVANS, 2001), mas é pouco provável ser a única explicação para os efeitos celulares benéficos sugeridos (SPENCER *et al.*, 2001).

Nas plantas superiores, grande parte dos flavonóides presentes nos tecidos vegetais encontra-se conjugada a moléculas de carboidratos (CROZIER *et al.* 1997; SKERGET *et al.* 2005). Segundo Harborne e Williams (2000), o canferol e a  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  quercetina são os flavonóis mais freqüentemente encontrados na forma conjugada a carboidratos, representando uma estratégia de adaptação e sobrevivência das plantas relacionada à proteção contra a radiação UV-B. Os resultados encontrados em nosso trabalho demonstram que as duas espécies em estudo possuem potencial contra danos celulares induzidos por agentes clastogênicos.

Ramirez-Mares e Colaboradores (2004) observaram a capacidade de extratos de erva-mate inibir a proliferação celular através do seu teor de flavonóides. Os flavonóides são o mais importantes componentes em extratos de erva-mate e foram capazes de inibir a proliferação de carcinoma bucal através da inibição da topoisomerase II.

Aberrações cromossômicas são parâmetros utilizados para avaliar a genotoxicidade de produtos químicos (TOPASHKA-ANCHEVA *et al.*, 2003) e o ensaio com *A. cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade (BAGATINI *et al.*, 2007).

Esforços para compreender os diferentes mecanismos pelos quais flavonóides influenciam as atividades biológicas poderia ajudar a discernir melhor as vantagens e desvantagens da sua utilização e esclarecer seu possível papel na proteção contra poluentes.

Uma das atividades atribuídas aos flavonóides se presume proteger a saúde humana, especialmente quando os flavonóides são constituintes naturais dos alimentos. Aconselha-se cuidado na sua utilização como suplementos alimentares uma vez que estes compostos podem causar modulação bifásica da proliferação de cólon específica e além de induzir a formação de células mamárias cancerosas (VAN DER WOUDE *et al.*, 2003; VAN DER WOUDE *et al.*, 2005).

#### 5.14 ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À *Artemia salina* LEACH

O *screening* inicial da atividade citotóxica foi realizado através do bioensaio de letalidade de larvas de *Artemia salina* L. Este ensaio caracteriza-se por apresentar baixo custo, ser rápido e não exigir técnicas assépticas. *A. salina* é um microcrustáceo componente da fauna aquática salina e de ecossistemas marinhos, utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas (SILVA *et al.*, 2007; PARRA *et al.*, 2001).

Dentre os extratos e frações investigados, foi verificado que os extratos e frações testados causam a mortalidade de *A. salina*. A FAE exibiu maior atividade tóxica comparada as demais frações em *A. extraaxillaris*, com  $DL_{50}$  igual a 232,99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 37).



TABELA 37. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A.extraaxillaris* NA MORTALIDADE E DL<sub>50</sub> DE *A. salina* EM LABORATÓRIO.

	Mortalidade/ Concentrações µg.mL <sup>-1</sup>						
	10	25	50	100	250	500	1000
EEB	6*	7*	7*	13*	16*	38*	51*
FH	3	5*	5*	8*	8*	12*	33*
FCL	2	5*	8*	12*	15*	17*	35*
FAE	8*	12*	19*	21*	24*	33*	57*
FR	5	25*	34*	37*	45*	49*	55*
TRITON	59*	61*	68*	68*	70*	75*	75*
							DL <sub>50</sub>
							>242,23
							>289,17
							>248,22
							>232,37
							>255,912
							>74,14

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

Dessa forma, a ausência de toxicidade para as folhas e cascas de *M. foetidus*, sugere que o mesmo pode vir a ser utilizado em ensaios mais detalhados de atividade antioxidante e citotóxica, uma vez que a resultados obtidos para atividade antineoplásica sugerem que a presença dessa atividade aliada a ausência de toxicidade em condições normais a torna importante para estudos mais detalhados. Em *M. foetidus*, a mortalidade foi verificada apenas para o EEB e frações dos frutos. Para a FAE, foi verificada uma DL<sub>50</sub> igual a 32,99 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo indicativo de toxicidade. Os extratos e frações das folhas e cascas não apresentaram atividade sobre a mortalidade de *A. salina* (tabela 38).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antibacteriana, parasiticida, tripanocida, entre outras. Mclaughlin e Colaboradores (1991) utilizam sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações e substâncias isoladas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. O teste também pode ser utilizado para triagem de atividade antitumoral de substâncias obtidas por

síntese orgânica. Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser considerada uma característica interessante para utilização de extratos vegetais.

TABELA 38. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FR) DAS FOLHAS DE *Microlobius foetidus*, NA MORTALIDADE E DL<sub>50</sub> DE *A. salina*.

FOLHAS								
Amostra	Mortalidade/ Concentrações µg.mL <sup>-1</sup>							
	10	25	50	100	250	500	1000	DL <sub>50</sub>
EEB	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	5 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup>	>1000
FH	0 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	3 <sup>ns</sup>	>1000
FCL	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	>1000
FAE	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	>1000
FR	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	5 <sup>ns</sup>	>1000
TRITON	59*	61*	68*	68*	70*	75*	75*	>74,14
CASCAS								
	10	25	50	100	250	500	1000	DL <sub>50</sub>
EEB	2 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	5 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	>1000
FH	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	3 <sup>ns</sup>	5 <sup>ns</sup>	5 <sup>ns</sup>	>1000
FCL	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	52*	>1000
FAE	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	>1000
FR	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	>1000
TRITON	59*	61*	68*	68*	70*	75*	75*	>74,14
FRUTOS								
	10	25	50	100	250	500	1000	DL <sub>50</sub>
EEB	54*	57*	60*	63*	59*	67*	70*	>42,47
FH	19*	22*	26*	30*	38*	42*	55*	>79,98
FCL	28*	56*	59*	67*	68*	69*	72*	>48,98
FAE	35*	38*	67*	68*	71*	72*	73*	>32,99
FR	32*	25*	34*	37*	45*	49*	55*	>75,99
TRITON	59*	61*	68*	68*	70*	75*	75*	>74,14

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

5.15 ATIVIDADE TÓXICA FRENTE À *Dugesia tigrina*

Os resultados apresentados para a atividade tóxica de *D. tigrina* foram semelhantes aos observados em *A. salina*. Neste ensaio foram utilizados o EEB e FAE das folhas cascas e frutos de *M. foetidus* foram avaliados, sendo que para *A. extraaxillaris* todas as frações e extrato bruto tiveram a atividade investigada por apresentaram atividade tóxica em *A. salina*. Os extratos e frações de *A. extraaxillaris* não apresentaram mortalidade em *D. tigrina*, quando comparadas à substância dicromato de potássio. Um maior número de indivíduos mortos foram observados para o EEB com 33,3% (tabela 39), entretanto estes valores não são estatisticamente significativos.

TABELA 39. MORTALIDADE DE *Dugesia tigrina* SUBMETIDA ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO (FAE) E REMANESCENTE (FR) DE *A. extraaxillaris*.

EEB			FCL		
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade	Concentração	Mortalidade	% de mortalidade
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100	Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 <sup>ns</sup>	6,7
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 <sup>ns</sup>	6,7	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 <sup>ns</sup>	13,3
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 <sup>ns</sup>	13,3	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,6 <sup>ns</sup>	18,6
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5 <sup>ns</sup>	33,3	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,7 <sup>ns</sup>	23,2
FH			FAE		
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade	Concentração	Mortalidade	% de mortalidade
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100	Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1	6,7	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 <sup>ns</sup>	13,3	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3 <sup>ns</sup>	20
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,4 <sup>ns</sup>	18,7,6	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,1 <sup>ns</sup>	23,3
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,1 <sup>ns</sup>	23,3	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,7 <sup>ns</sup>	23,7
FR					
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade			
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100			
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0			
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 <sup>ns</sup>	6,7			
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,6 <sup>ns</sup>	7,1			
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4 <sup>ns</sup>	24,5			

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $P < 0,05$ ) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup> A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

Efeito similar foi observado para o EEB e FAE das folhas e cascas de *M. foetidus*, não sendo verificada mortalidade quando submetidos às diferentes concentrações (tabela 40). A maior concentração do EEB dos frutos provocou a mortalidade de 80% dos indivíduos testados, e a taxa de mortalidade foi de 100% para a FAE.

TABELA 40. MORTALIDADE DE *Dugesia tigrina* SUBMETIDA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *Microlobius foetidus*.

FOLHAS			FAE		
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade	Concentração	Mortalidade	% de mortalidade
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100	Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 <sup>ns</sup>	6,7
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 <sup>ns</sup>	6,7	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 <sup>ns</sup>	7,1
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3 <sup>ns</sup>	20	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3 <sup>ns</sup>	20
CASCAS			FAE		
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade	Concentração	Mortalidade	% de mortalidade
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100	Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
FRUTOS					
EEB			FAE		
Concentração	Mortalidade	% de mortalidade	Concentração	Mortalidade	% de mortalidade
Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100	Dicromato (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	15	100
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0 <sup>ns</sup>	0
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5*	33,3	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	7*	26,6
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	9*	60	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12*	80
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12*	80	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15*	100

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $P < 0,05$ ) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

A partir destes resultados, foi verificado se as concentrações de 50, 25, e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do EEB e FAE de *A. extraaxillaris* e diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* interferem na regeneração da região cefálica de *D. tigrina*. As menores concentrações foram utilizadas, tendo em vista que concentrações acima de 50

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  causam mortalidade das larvas, não sendo possível avaliar a interferência na regeneração. A concentração de  $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de dicromato de potássio também foi utilizada visto que não causa a total mortalidade dos indivíduos testados.

Os resultados demonstram que para a espécie *a. extraaxillaris*, apenas a maior concentração atrasou a regeneração cefálica de *D. tigrina* (tabela 41). O eeb foi a amostra que mais atrasou o processo de regeneração, sendo verificada uma porcentagem de atraso de 82,2% em relação às demais concentrações. Entretanto a fae afetou de forma mais acentuada a regeneração cefálica, com 3,9 mm de comprimento na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O EEB a regeneração cefálica também foi afetada com 4,2 mm (tabela 41). Com base nestes dados, é verificado que a concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  afeta a proliferação celular em *D. tigrina*. Resultados semelhantes foram observados para a fae dos frutos de *M. foetidus*.

TABELA 41. REGENERAÇÃO DA REGIÃO CEFÁLICA DE *D. tigrina* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO (FAE) E ETANOL- ÁGUA (FEA) DE *A. extraaxillaris*.

EEB			
Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,4	5,8	31,2
Dicromato ( $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	9,3*	1,3*	100*
15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,5 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>ns</sup>	32,3 <sup>ns</sup>
25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,3 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	31,7 <sup>ns</sup>
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	7,7*	4,2*	82,8*
FAE			
Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso
0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,4	5,8	31,3
Dicromato ( $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	9,3*	1,3*	100*
15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,3 <sup>ns</sup>	5,7 <sup>ns</sup>	31,9 <sup>ns</sup>
25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,8 <sup>ns</sup>	5,8 <sup>ns</sup>	36,5 <sup>ns</sup>
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	9,61*	3,9*	80,22*

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $P < 0,05$ ) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

A maior concentração do EEB causou atraso na regeneração em 102,3%, onde a regeneração se deu após 9,8 dias. A FAE também afetou a regeneração celular em *D. tigrina* onde a regeneração ocorreu após 12,8 dias, com uma porcentagem de atraso igual a 103,4%. Todas as concentrações dos frutos afetaram o processo de regeneração (tabela 42).

TABELA 42. REGENERAÇÃO DA REGIÃO CEFÁLICA DE *D. tigrina* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO (FAE) E ETANOL- ÁGUA (FEA) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus*.

FOLHAS							
EEB				FAE			
Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso	Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso
0 µg.mL	6,4	5,8	42,7	0 µg.mL	6,4 <sup>ns</sup>	5,8	42,7
Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100*	Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100*
15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,6 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>	15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,2 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	40,3 <sup>ns</sup>
25 µg.mL <sup>-1</sup>	6,5 <sup>ns</sup>	5,7 <sup>ns</sup>	41,9 <sup>ns</sup>	25 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>
50 µg.mL <sup>-1</sup>	6,6 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	40,3 <sup>ns</sup>	50 µg.mL <sup>-1</sup>	6,1 <sup>ns</sup>	5,3 <sup>ns</sup>	43,2 <sup>ns</sup>
CASCAS							
Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso	Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso
0 µg.mL	6,4	5,8	42,7	0 µg.mL	6,4	5,8	42,7
Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100*	Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100*
15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,4 <sup>ns</sup>	5,9 <sup>ns</sup>	41,9 <sup>ns</sup>	15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,7 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>
25 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>	25 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>
50 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>	50 µg.mL <sup>-1</sup>	6,3 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>ns</sup>	41,5 <sup>ns</sup>
FRUTOS							
Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso	Concentração	Regeneração (dias)	Tamanho (mm)	Porcentagem de atraso
0 µg.mL	6,4	5,8	42,7	0 µg.mL	6,4	5,8	42,7
Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100	Dicromato (35 µg.mL <sup>-1</sup> )	9,3*	1,3*	100
15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,5*	3,3*	76,3	15 µg.mL <sup>-1</sup>	6,7*	1,5*	77,1
25 µg.mL <sup>-1</sup>	7,1*	2,5*	76,4	25 µg.mL <sup>-1</sup>	6,9*	1,3*	77,9
50 µg.mL <sup>-1</sup>	9,8*	0,7*	102,3	50 µg.mL <sup>-1</sup>	12,8*	0,6	103,4

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE.

O dicromato de potássio foi utilizado por ser um sal inorgânico, cristalino e de cor vermelho-alaranjado, solúvel em água. É muito usado na indústria química como agente de oxidação analítico, principalmente na produção de latão, tecidos, corantes, além de larga utilização na indústria pirotécnica e fabricação de

explosivos, tratamento de couro e da madeira, entre outros usos mais comuns. Pode causar diversos danos à saúde humana, como, por exemplo, o pó causa irritação nos olhos, nariz e garganta, e sua inalação pode implicar em dificuldades respiratórias; o sólido provoca queimaduras na pele e, se ingerido, leva a náuseas, vômitos e até perda de consciência, além de ser uma substância comprovadamente cancerígena, fatores esses que requerem cuidados em seu manuseio. No ambiente, mesmo em pequenas concentrações, pode causar distúrbio a vários organismos, como paralisação de atividades essenciais, ou até mesmo levar à grande mortalidade (CETESB, 1994). Todos estes parâmetros justificam o uso do dicromato nos ensaios. O tempo de regeneração encontrado para *D. tigrina* nos testes realizados, pode ser relacionado à capacidade de reprodução assexuada desta espécie, visto que a velocidade de regeneração posterior pode ser aumentada em espécies capazes deste tipo de reprodução (REDDIEN; SÁNCHEZ ALVARADO, 2004).

Nos testes de sensibilidade para dicromato de potássio realizados por Annibale (2009), nas concentrações menores de 20 mg.mL. Não houve efeito letal sobre os animais testados, enquanto para valores superiores a 40 mg.mL, houve 100% de mortalidade em 4 dias. O valor mais aproximado de CL<sub>50</sub> foi para a concentração de 30 µg.mL. Estes resultados justificam a concentração de dicromato de potássio utilizada neste ensaio. Ainda nos testes realizados por Annibale (2009), observou-se que o processo de regeneração cefálica das planárias ocorreu em todos os animais submetidos ao dicromato de potássio, porém, não foi possível afirmar se essa substância exerceu retardo sobre o tempo natural de regeneração, pois não foram feitas avaliações individuais, nem entre as diferentes concentrações.

Os resultados obtidos na avaliação da regeneração celular em *D. tigrina* demonstram o potencial antiploriferativo destas frações pois atuam na inibição da divisão celular. A célula cancerígena possui divisão celular descontrolada, sendo capaz de invadir e colonizar regiões destinadas a outras células que enviam, recebem, interpretam e respondem a um conjunto sofisticado de sinais que servem para a homeostase da célula e do tecido a que pertencem. Assim, cada uma se comporta de maneira social e responsável, alternando estados de repouso, divisão, diferenciação e morte, em prol do bem-estar do organismo (JOHNSON *et al.*, 2001).

Atualmente, muitas pesquisas estão voltadas para a utilização de fitoterápicos capazes de inibir a angiogênese e reduzir o risco de metástases (ZHANG, 2002). Além disso, De Feudis e Colaboradores (2003) sugerem que a atividade antiangiogênica de extratos envolve sua capacidade antioxidante e inibitória das formas indutíveis e endoteliais da enzima óxido nítrico sintetase.

Uma interessante abordagem na terapia contra o câncer está relacionada à cascata inflamatória e ao início, promoção e progressão do tumor como a angiogênese e a metástase. Os eicosanóides são produzidos tanto pelos tecidos quanto pelos leucócitos infiltrantes no tumor, e seus efeitos resultam na proliferação e no reparo do tecido, na permeabilidade vascular, na inflamação e no comportamento do sistema imune (DEMPKE *et al.*, 2001).

Desta forma, a presença de flavonóides pode estar associada à atividade antiploriferativa observada nos extratos e frações testados. A ação antioxidante dos extratos e frações testados podem estar diminuindo os níveis de EROs na célula, o que leva à inibição da ativação de fatores de transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento e na agressividade do câncer. Portanto, *A. extraaxillaris* e *M. foetidus* constituem uma nova classe de substâncias com potente atividade biológica, e seu uso tanto na prevenção quanto no tratamento de vários tipos de câncer deve ser investigado *in vivo* para definir se os mesmos podem ou não serem utilizados na medicina convencional. Entretanto, os níveis de toxicidade também devem ser melhor investigados, com a finalidade de estabelecer a forma de utilização destas espécies.

## 5.16 ATIVIDADE LARVICIDA

### 5.16.1 MORTALIDADE EM *A. aegypti*

A atividade larvica do EEB e FAE de *A. extraaxillaris* e diferentes partes morfológicas de *M. foetidus* foram avaliados por ter demonstrado maior atividade



biológica para os ensaios realizados. Na mortalidade de *A. aegypti*, foi verificado que os extratos e frações de *A. extraaxillaris* não causaram a mortalidade das larvas nos estágios testados (tabela 43). Dessa forma, a atividade da inibição da acetilcolinesterase, tripsina e quimiotripsina não foram avaliadas. Para a espécie *M. foetidus*, foram realizados ensaios com a FAE das folhas, cascas e frutos e extratos das sementes, além da avaliação com os óleos voláteis das folhas.

TABELA 43. ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DE *A. extraaxillaris*.

EEB					
Estádio	Controle	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	DL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1º instar	2	2 <sup>ns</sup>	4 <sup>ns</sup>	8 <sup>ns</sup>	>1000
2º instar	1	0 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	4 <sup>ns</sup>	>1000
3º instar	3	1 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	4 <sup>ns</sup>	>1000
4º instar	2	1 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	4 <sup>ns</sup>	>1000
Temefós: 75*					≤60
FAE					
Estádio	Controle	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	DL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1º instar	2	6 <sup>ns</sup>	10 <sup>ns</sup>	35*	>1000
2º instar	1	8 <sup>ns</sup>	12 <sup>ns</sup>	20*	>1000
3º instar	3	6 <sup>ns</sup>	10 <sup>ns</sup>	51*	>1000
4º instar	2	6 <sup>ns</sup>	10 <sup>ns</sup>	50*	>1000
Temefós: 75*					≤60

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) PELO TESTE DE DUNNET.

<sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE. NOTA: DL<sub>50</sub> É A CONCENTRAÇÃO CAPAZ DE CAUSAR A MORTALIDADE DE 50% DAS LARVAS

A avaliação da atividade larvicida demonstrou que estes apresentam atividade tóxica nas larvas avaliadas, em todos os estádios. As folhas foram menos tóxicas do que as cascas que apresentaram DL<sub>50%</sub> igual a 140,421  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  nas larvas do 3º estágio. As menores concentrações foram observadas para as larvas do 4º instar submetidas aos frutos com DL<sub>50%</sub> 33,02  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 43). O extrato dos frutos se mostrou mais tóxico para larvas do 3º e 4º estádios. Os extratos das sementes também demonstraram alta mortalidade nas larvas. Ao contrário do que foi observado para os extratos dos frutos, os extratos das sementes afetaram de maneira mais acentuada as larvas no primeiro estágio. Um maior efeito tóxico foi

observado para a FH, com  $DL_{50\%}$  igual a  $49,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 44). Os óleos voláteis também apresentaram potencial no controle biológico de *A. aegypti*, sendo verificado uma  $DL_{50\%}$  igual a  $33,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o 4º estágio larval, demonstrando maior efeito tóxico para as larvas no final da fase larval (tabela 44).

TABELA 44. ATIVIDADE LARVICIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) DAS FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE *M. foetidus*.

FOLHAS					
	Controle	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1º estágio	2	28*	38*	44*	>237,31
2º estágio	1	26*	33*	40*	>246,33
3º estágio	3	25*	31*	38*	>258,22
4º estágio	2	23*	28*	33*	>273,43
CASCAS					
	Controle	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1º estágio	2	22*	27*	34*	>135,43
2º estágio	1	20*	23*	30*	>133,45
3º estágio	3	18*	21*	30*	>141,21
4º estágio	2	15*	20*	28*	>135,23
FRUTOS					
	Controle	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1º estágio	2	28*	46*	55*	>45,68
2º estágio	1	28*	43*	52*	>43,69
3º estágio	3	26*	41*	51*	>40,42
4º estágio	2	23*	41*	50*	>33,02

\*A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $P < 0,05$ ) PELO TESTE DE DUNNET. <sup>ns</sup>A MÉDIA DO TRATAMENTO NÃO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE. NOTA:  $DL_{50}$  É A CONCENTRAÇÃO CAPAZ DE CAUSAR A MORTALIDADE DE 50% DAS LARVAS

Luna e Colaboradores (2004), verificaram que o efeito do extrato sobre os diferentes estádios de *A. aegypti* pode estar relacionado com a tolerância da fase biológica e ao mecanismo do extrato, além dos métodos e das concentrações utilizadas, como demonstrado em nosso trabalho, onde larvas do 1º e 4º estádios foram as mais afetadas.

O efeito larvicida observado para o EH das sementes pode estar ocorrendo pela presença do ácido esteárico, encontrado em maior porcentagem na

composição deste extrato. Ribeiro (2008) reporta a atividade larvícida dos extratos das sementes de *Cnidocolus phyllacanthus*, sendo essa atividade larvícida atribuída a presença dos ácidos mirísticos, palmítico, esteárico, oléico, linoléico e araquídico.

Estes resultados também demonstram o aumento da mortalidade em função do aumento das concentrações, e que são esse reforçados por dados na literatura em que o aumento da concentração diminui a resistência da ecdúvia larval presente nas pupas maximizando ação dos extratos. Esse fato também foi observado por Murugan e Colaboradores (2007) com extratos de *Albizia amara* e *Ocimum basilicum* que obtiveram ação pupicida nas maiores concentração de 20.000 ppm a 100.000 ppm.

Os extratos e frações que tiveram considerável atividade tóxica foram avaliados quanto ao teor de tripsina, quimiotripsina e acetilcolinesterase. Os ensaios que medem a atividade da tripsina e quimiotripsina foram realizadas pelo fato de que a tripsina e quimiotripsina são as enzimas digestivas mais importantes em *A. aegypti* e ocorrem em todas as fases do seu ciclo biológico, sendo muito expressas nas fases de larva e pupa (YANG; DAVIES, 1971; VENANCIO *et al.*, 2009). A ação sobre a inibição da acetilcolinesterase ocorreu pelo fato de que a ocorrência de resistência em larvas tem sido atribuída a alterações nos níveis dessa enzima (BRAGA; VALLE, 2007; MELO-SANTOS *et al.*, 2010). Extratos com ação sobre a inibição da acetilcolinesterase possuem alto potencial para atuar como pesticidas de origem natural.

Na atividade da tripsina, foi verificado que para a FAE de *A. extraaxillaris*, somente a maior concentração interferiu na atividade da tripsina, com diminuições na atividade de  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  em todos os estádios (figura 71).

■ Controle ■ 250 µg.mL ■ 500 µg.mL □ 1000 µg.mL

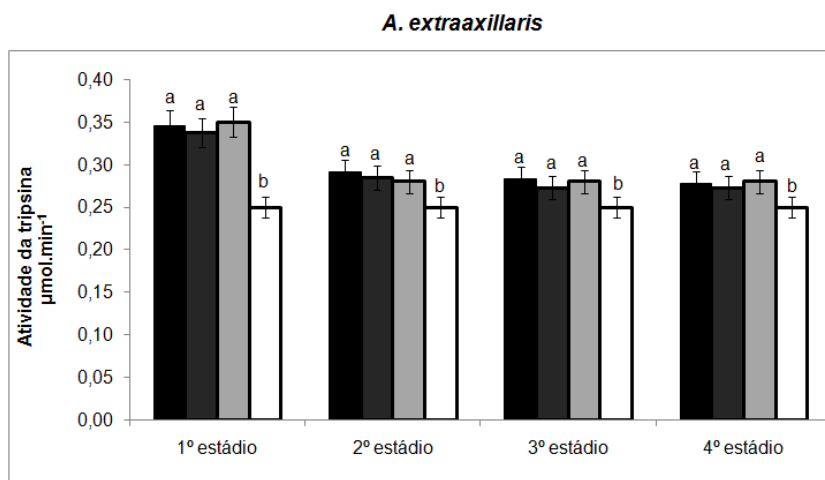


FIGURA 71. EFEITO DA FAE DE *A. extraaxillaris* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $p < 0.05$ ).

Valores de inibição da atividade também foram verificados para a FAE dos frutos e EH das sementes. As maiores concentrações da FAE inibiram a atividade da tripsina em larvas de *A. aegypti*, com inibição acentuada para larvas no 4º estágio ( $10 \mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ ) (figura 72). Similar ao que foi observado para a FAE dos frutos o EH das sementes também diminuiu a atividade da tripsina, com valores de inibição mais acentuados no 3º e 4º estádios de desenvolvimento larval ( $10 \mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ ) (figura 72).

A inibição da tripsina também foi observada para os óleos voláteis de *M. foetidus*. o estágio larval mais afetado foi o 4º, com atividade de  $17 \mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$  (figura 73). os inibidores vegetais de enzimas digestivas destacam-se por apresentarem uma alternativa ao uso de inseticidas químicos. os resultados obtidos sugerem que *M. foetidus* pode atuar como um potente inibidor de tripsina em *A. aegypti*, e que pelo método de extração, as substâncias responsáveis não são de natureza protéica.

■ Controle ■ 250 µg.mL ■ 500 µg.mL □ 1000 µg.mL

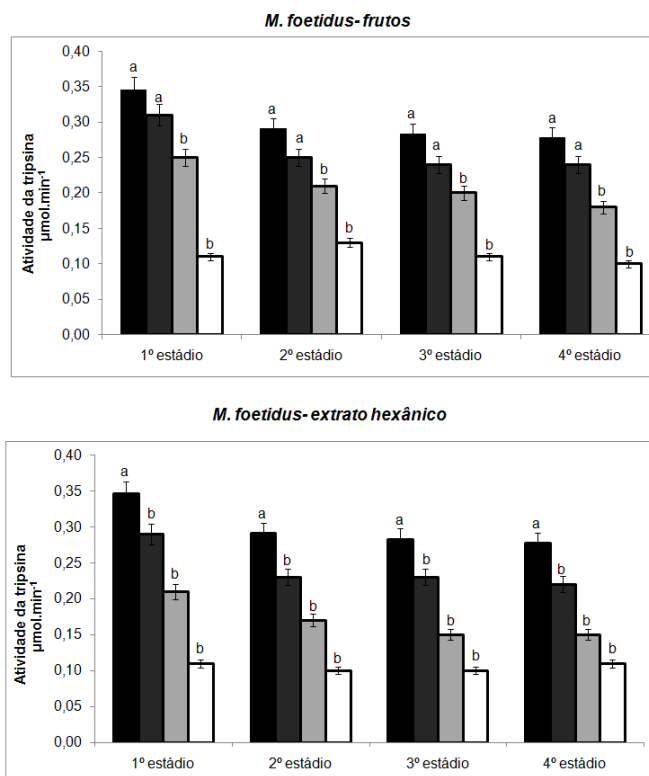


FIGURA 72. EFEITO DA FAE DOS FRUTOS E EXTRATO HEXÂNICO DE *M. foetidus* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

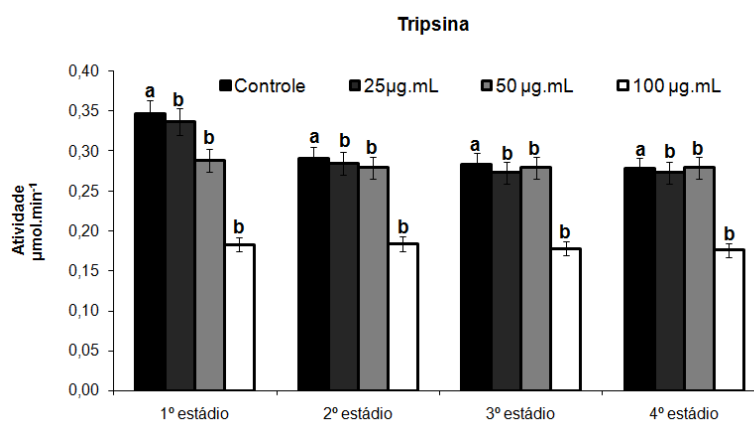


FIGURA 73. EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. FOETIDUS* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

O intestino médio das fêmeas do mosquito *A. aegypti* sintetizam duas formas de tripsina após a alimentação com sangue, a tripsina precoce e tardia. A tripsina precoce é produzida em pequenas quantidades e aparece no intestino médio cerca de 1 h após a alimentação e desaparece cerca de 6 a 8 h após a alimentação. A tripsina tardia é produzida em grandes quantidades e começa a aparecer de 8 a 10 h após a alimentação (NORIEGA; WELLS, 1990).

Assim é plausível o uso de extratos de plantas contendo diferentes princípios ativos (metabólitos secundários, tais como, inibidores de tripsina, quimiotripsina e acetilcolina) que possam impedir o desenvolvimento da resistência larval por uma variedade de diferentes substâncias que possam atuar em vários mecanismos de ação inseticida (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2004). Larvas tratadas com as diferentes concentrações dos óleos voláteis tiveram diminuição na síntese de acetilcolinesterase e quimiotripsina, e um efeito de dose- dependência também foi verificado. Efeitos inibitórios foram observados em todos os estágios, com menor síntese enzimática para a concentração de 100 µg.ml ( $0,256 \mu\text{mol.min}^{-1}$ ) no 4º estágio larval ( $0,172 \mu\text{mol.min}^{-1}$ ) (figura 74).

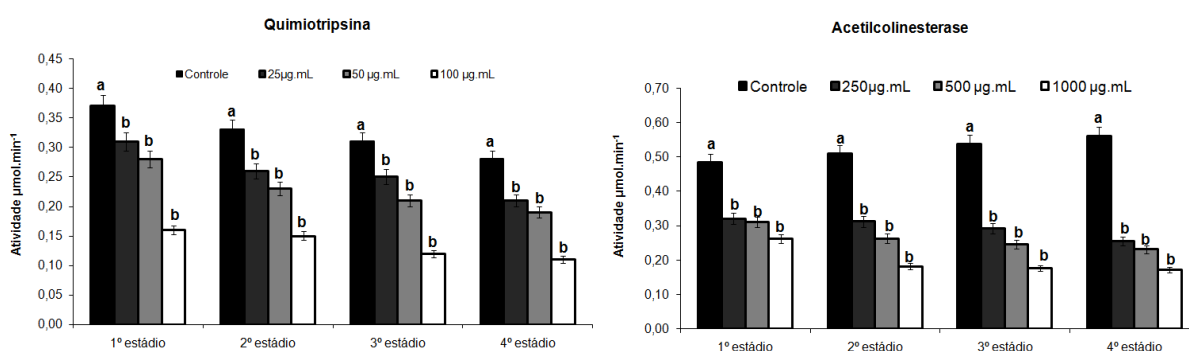


FIGURA 74. EFEITO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus* NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

Na atividade da quimiotripsina, foi verificado que para a espécie *A. extraaxillaris*, somente a maior concentração da FAE inibiu a produção em *A.*

*aegypti*, sendo o efeito inibitório mais intenso observado para o 1º estágio ( $0,22 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (Figura 75).

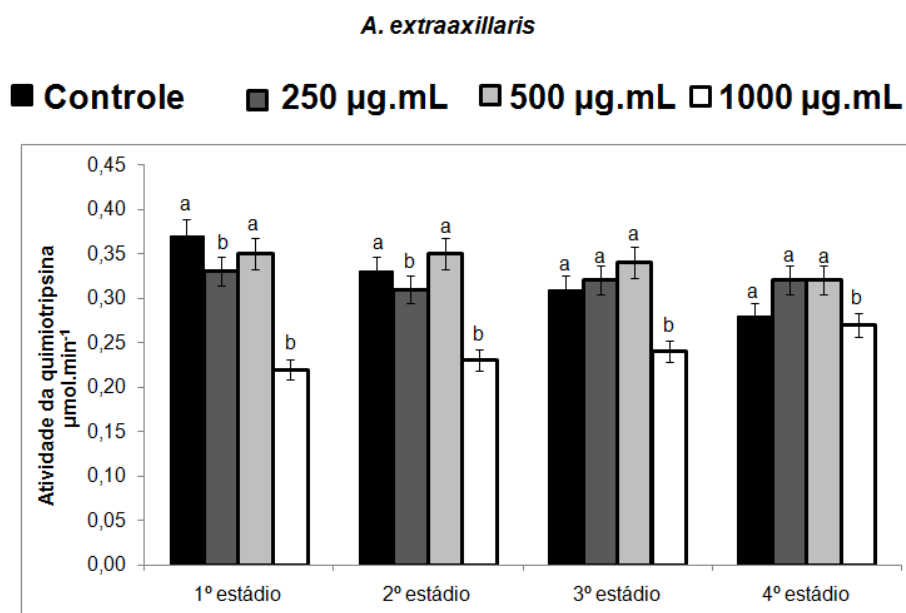


FIGURA 75. EFEITO DA FAE DE *A. extraaxillaris* NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).

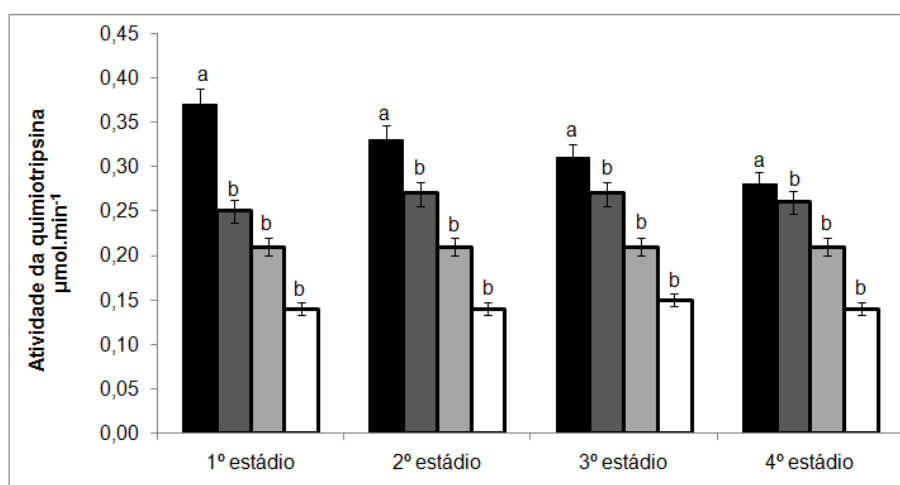
A FAE dos frutos e EH das sementes de *M. foetidus* também afetaram a produção de quimi tripsina em todas as concentrações ensaiadas. Não houve diferença na inibição em função do estágio larval na FAE dos frutos e maior efeito inibitório foi verificado para a concentração de  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  com  $0,14 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  (figura 76). A atividade da quimi tripsina também foi diminuída. Uma menor síntese foi observada para o 1º estágio submetidas à FAE de *A. extraaxillaris* ( $0,22 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ), e para a FAE dos frutos ( $0,14 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  para quimi tripsina) e FH ( $0,10 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ) de *M. foetidus* (figuras 76).

Uma das preocupações sobre o uso de inibidores de tripsina e quimi tripsinas como inseticidas é o fato de que os insetos são capazes de modificar o seu conjunto de proteases digestivas, em resposta aos efeitos antimetabólicos destas moléculas. No entanto, tem sido demonstrado que alguns inibidores podem ser considerados como potentes inseticidas, uma vez que os insetos afetados por eles

não foram capazes de se adaptar à ingestão de inibidor (MACEDO *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2010).

■ Controle ■ 250 µg.mL ■ 500 µg.mL □ 1000 µg.mL

*M. foetidus*-frutos



*M. foetidus*-extrato hexânico

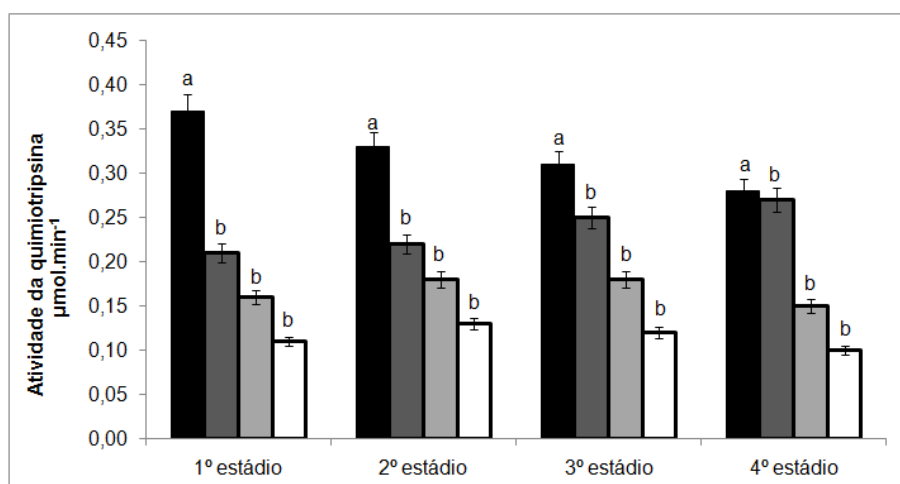


FIGURA 76. EFEITO DA FAE DE DOS FRUTOS DE *M. foetidus*) E EH DAS SEMENTES DE *M. foetidus* NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ( $P < 0.05$ ).



A inibição da atividade destes extratos pode indicar que este não tem como alvo uma única substância, o que poderia dificultar a adaptação das larvas. Em larvas de *A. aegypti*, as proteases são mecanismos altamente ativos e regulam diferentes atividades, tal como o controle da transdução do RNAm para tripsina, quimiotripsina e inibidores de proteases endógenas (YANG; DAVIES, 1971;. HO *et al.*, 1992).

O tratamento de larvas, com os inibidores de protease exógena pode conduzir a um desequilíbrio na regulação de atividade da protease. Um inibidor de tripsina em sementes de *Ellipticum archidendron* promoveu uma diminuição na atividade da tripsina contra larvas de *Spodoptera litura* criadas em dieta contendo o um inibidor, em comparação com larvas alimentadas com a dieta com extrato, demonstrando a influência de um inibidor de tripsina e quimiotripsina exógeno, alterando a fisiologia do intestino larval (BHATTACHARYYA *et al.*, 2007). Alguns efeitos dos inibidores sobre as larvas incluem redução no peso do corpo, bem como atraso e perturbação do desenvolvimento (BHATTACHARYYA *et al.*, 2007;. OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009).

Inibidores de tripsina normalmente não parecem causar toxicidade aguda em insetos, mas tem sido demonstrado que os danos para os processos de digestão de insetos por inibidores de tripsina e quimiotripsina têm sido associados com a mortalidade dos insetos. Além disso, a capacidade destes inibidores ter efeitos deletérios contra insetos depende da sensibilidade. É comum que os inibidores de tripsina de diferentes origens exercem efeitos diferentes sobre insetos. Prasad e Colaboradores (2010) mostraram que os inibidores de proteases a partir de extratos da soja inibiu a atividade de tripsina no intestino médio de *Papilio demoleus*.

De acordo com Yang e Davies (1971), a baixa atividade da tripsina é observada entre a fase de ecdise, larva e pupa de *A. aegypti*, e que provavelmente ocorre devido à falta de alimentação durante este período. No entanto, a ausência de variações significativas na atividade da tripsina nas larvas mantidos em água livre de cloro (Controle) assegura que a diminuição da atividade da tripsina após incubação não foi devida à passagem do estágio larval. Os resultados do ensaio *in vivo* corroboraram a hipótese de que o mecanismo larvicida exercido envolve a inibição da tripsina de intestino, e nenhuma interferência na atividade da Acetilcolinesterase em *A. extraaxillaris*.

Os organofosforados atuam inibindo a Acetilcolinesterase, importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de acetilcolina resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Conseqüentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto.

A utilização do controle químico continua sendo uma das principais táticas utilizadas para o combate dos vetores, entretanto, devido à resistência adquirida pelos culicídeos e às escassas opções de novos inseticidas, a situação torna-se crítica (CHAMBERS *et al.* 1995).

O mosquito *Aedes aegypti*, cuja população se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais, apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (PAUL *et al.*, 2006). Dessa forma, o uso de plantas com atividade sobre a acetilcolinesterase podem ser utilizados como alternativa para a resistência do mosquito aos pesticidas encontrados no comércio. Embora a espécies *A. extraaxillaris* e EH das sementes de *M. foetidus* tenham apresentado atividade inibitória sobre *Aedes*, com valores inferiores aos demais extratos, estes afetam as larvas pela inibição da tripsina e quimiotripsina causando a mortalidade, pelo processo de inibição enzimática.

Por causa do aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos, a pesquisa sobre os recursos naturais e inseticidas biodegradáveis tem aumentado, visando minimizar ambiental dano, encontrar novos compostos que promovem a mortalidade das larvas e a impedir a criação das larvas resistentes devido à rotação de compostos. Alguns extratos de plantas já possuem atividade inseticida comprovada, e esses potenciais fitoinsecticidas podem ser alternativos mais seguras para o controle do mosquito, uma vez que se espera que apresentem um elevado grau de biodegradação (PROMSIRI *et al.*, 2006; MURUGAN *et al.*, 2007; RAHUMAN *et al.*, 2008). A vantagem no uso de extratos de plantas contendo diferentes princípios ativos (metabolitos secundários, tais como, inibidores de tripsina, quimiotripsina e acetilcolina) é que eles podem impedir o desenvolvimento de resistência larval porque uma variedade de diferentes compostos podem atuar em vários mecanismos de ação inseticida (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2004).

Alterações morfológicas externas foram verificadas nas larvas expostas aos óleos voláteis e FAE dos frutos de *M. foetidus* após 24 horas de exposição. As principais alterações observadas foram exoesqueleto flexíveis e de fácil rompimento e alongamento da parte anterior ao tórax (FIGURA 77 C,D,E e F) e alongamento entre o tórax e a cápsula cefálica (Figura 77 G e H). Estes resultados são semelhantes ao encontrados na avaliação de alterações morfológicas do pesticida Diflubenzurom na ecdise de larvas de *A. aegypti* (BORGES *et al.*, 2004).

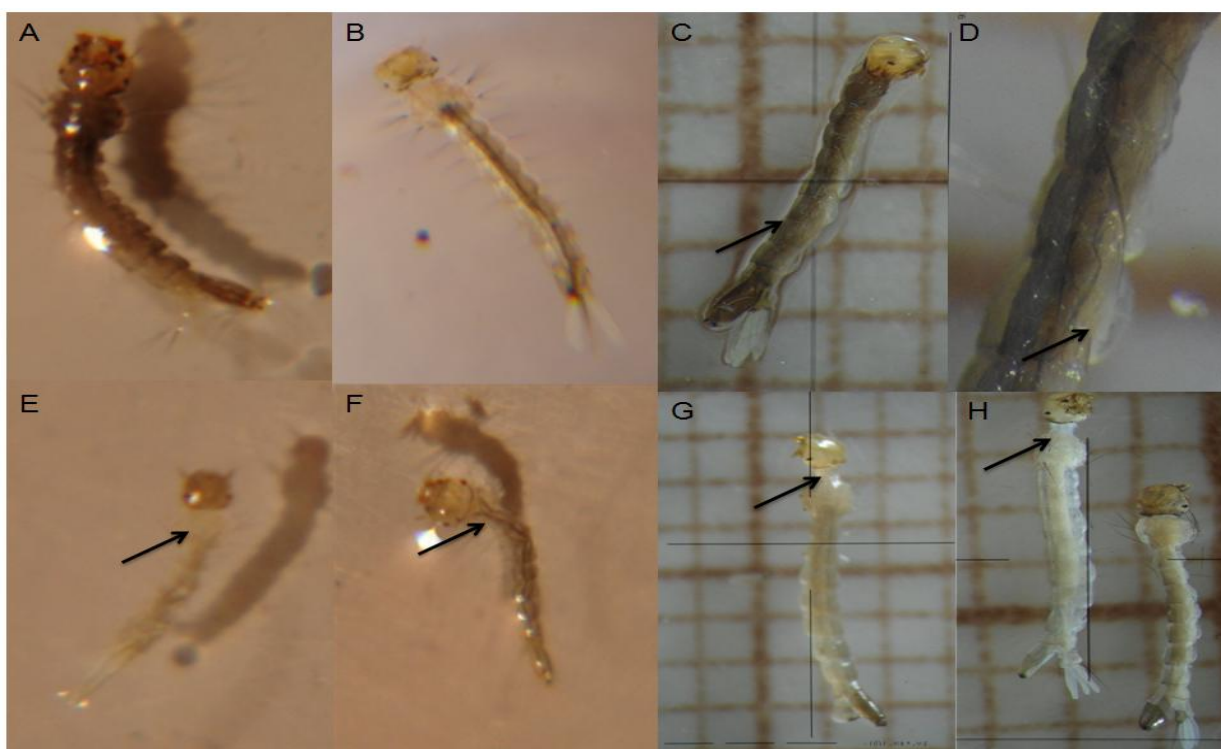


FIGURA 77. LARVAS DE *A. aegypti* TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E FAE DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus*. CONTROLE DEMONSTRANDO O ASPECTO NORMAL DA LARVA NO 3º ESTÁDIO (A,B), LARVA NO 3º ESTÁDIO DEMONSTRANDO EXOESQUELETO FLEXÍVEL E DE FÁCIL ROMPIMENTO (C,D), Aalongamento da parte anterior ao tórax (E, F) e alongamento entre o tórax e a cápsula cefálica (G,H).

Outras alterações na anatomia também foram observadas. Larvas tratadas com os óleos voláteis e frutos de *M. foetidus* apresentaram alterações na região

anterior do intestino médio das larvas no início do desenvolvimento, demonstrando rompimento na estrutura da membrana peritrófica (MP).

Larvas tratadas com a concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos óleos voláteis apresentaram espessamento da membrana peritrófica e o epitélio subperitrófico menos espesso. O tecido epitelial também se apresentou mais fino e claro, quando comparado ao controle e o alongamento da região entre o tórax e cápsula cefálica foram observados (figuras 78 B e C). De forma semelhante, as concentrações de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  causaram o espessamento e escurecimento da membrana peritrófica e espessamento do epitélio subperitrófico. O tecido epitelial se mostrou descontínuo nos segmentos do tecido e a região entre a cápsula cefálica e tórax também se apresentou mais alongada (figuras 78 D e E). As mesmas alterações foram observadas na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figuras 78 F e G), e também foi possível observar o alargamento do tubo digestivo em algumas larvas. O tecido epitelial também se apresentou menos espesso e um alargamento no tubo digestivo foi observado para algumas larvas, e o epitélio descontínuo também foi observado (Figura 78 G).

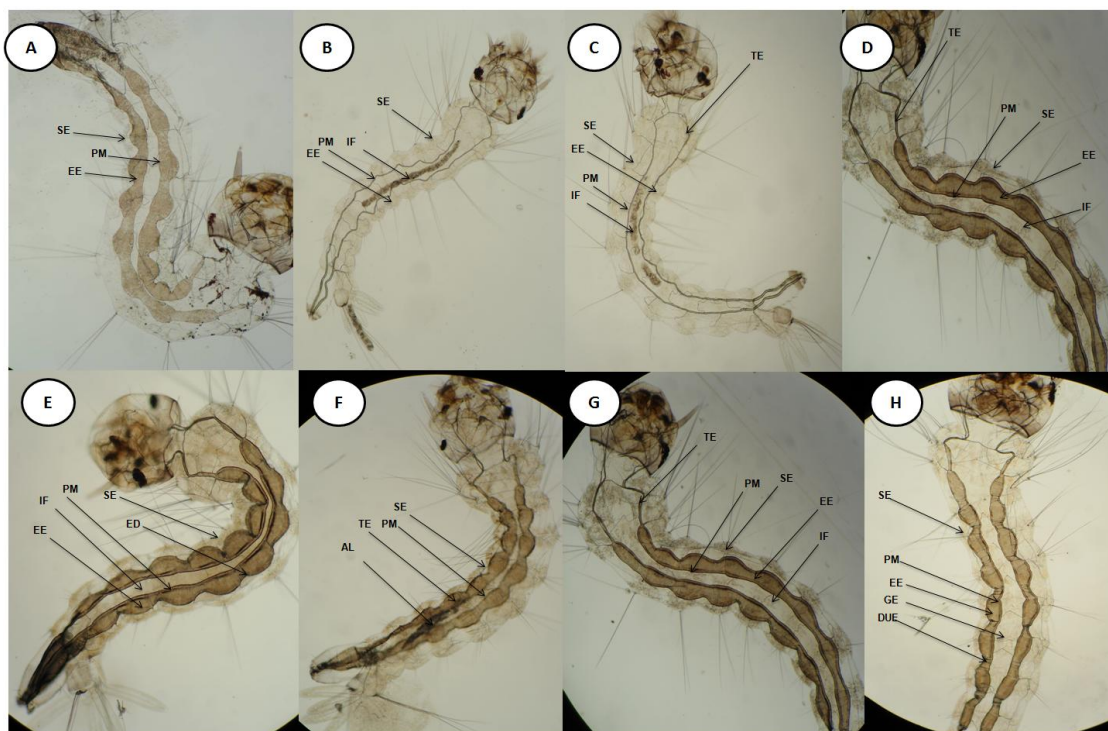


FIGURA 78. LARVAS DE *A. aegypti* TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS OLEOS VOLÁTEIS DE *M. foetidus*. ONDE: A- CONTROLE; B, C-  $25 \mu\text{g.mL}$ , D, E-  $50 \mu\text{g.mL}$ , F, G E H-  $100 \mu\text{g.mL}$ . \*Nota= SE: EPITÉLIO SUBPERITRÓFICO, EE: EPITÉLIO ENDOPERITRÓFICO, PM: MEMBRANA PERITRÓFICA, IF:ALIMENTO INGERIDO, TE: TÓRAX EXTENDIDO. (40x, 900  $\mu\text{m}$ ).

Larvas tratadas com a FAE dos frutos de *M. foetidus* tiveram o epitélio subperitrófico descontínuo, o que aumentou o lúmen intestinal (figura 79 A, E e F), criando segmentos com aspectos hipertróficos em comparação com as larvas do controle (figura 79 B, C, D, G e H). O atraso no desenvolvimento pode estar diretamente ligado as alterações morfológicas que ocorrem quando as larvas nos primeiros estágios ficaram em contato com as diferentes concentrações dos extratos e frações. Outras alterações como Atrofia no intestino médio (Figura 79 B), rompimento do epitélio (Figura 79 C, E, F e G) e espessamento da camada primária do epitelial subperitrófico também foram observadas para a FAE dos frutos (Figura 79 D, e H), nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

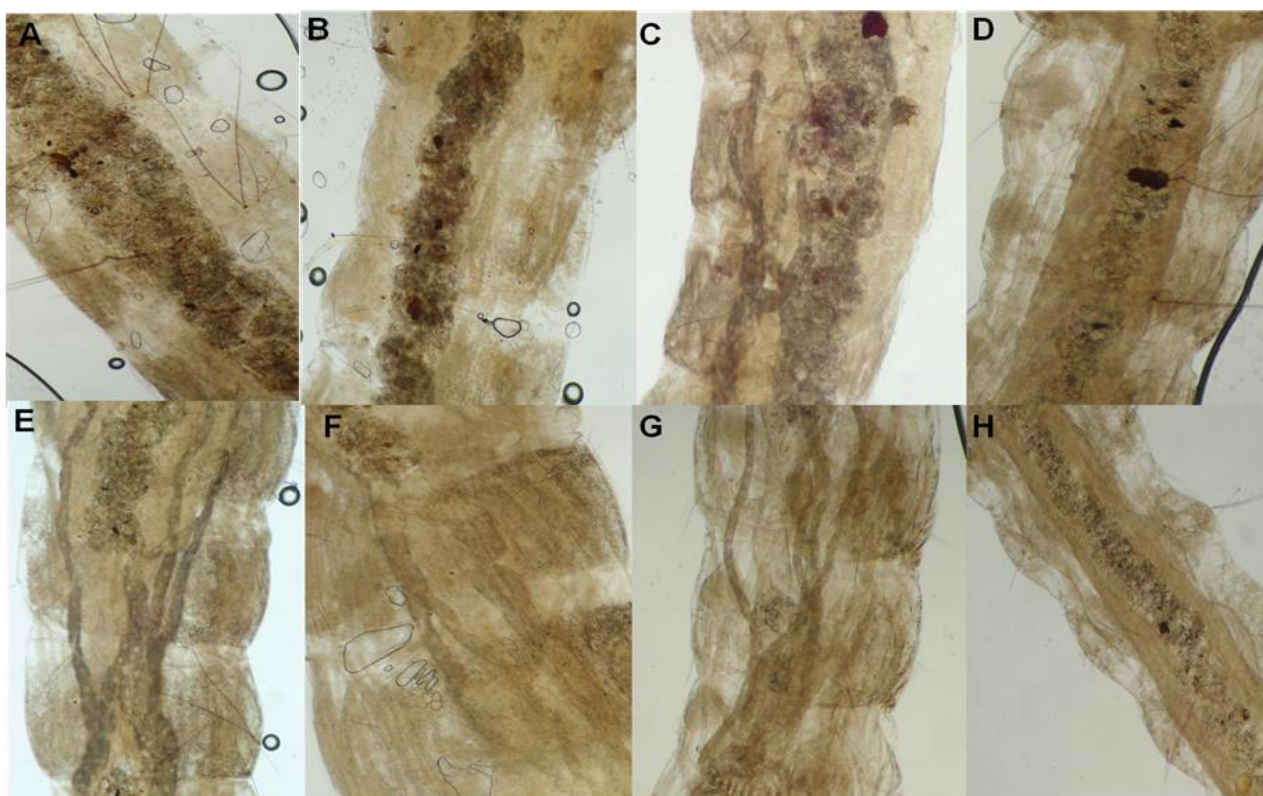


FIGURA 79. LARVAS DE *A. aegypti* TRATADAS COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E FAE DOS FRUTOS DE *Microlobius foetidus*. CONTROLE DEMONSTRANDO O ASPECTO NORMAL DA LARVA NO 3º ESTÁDIO (A), LARVA DEMONSTRANDO ATROFIA NO INTESTINO MÉDIO (B), ROMPIMENTO DO EPITÉLIO (C, E, F, G) E ESPESSAMENTO DA CAMADA PRIMÁRIA DO ENVELOPE EPITELIAL (D, H).



Em vertebrados, o muco é secretado próximo à camada primária, com a finalidade de proteger o epitélio intestinal, enquanto auxilia no processo de digestão (CICCIA; COUSSIO; MONGELLI, 2000). No entanto, os insetos não possuem uma típica camada de muco no trato digestivo e, em vez disso, este é revestido por uma estrutura de proteção única, o envelope peritrófico (EP) (PETERS, 1992). O EP é uma estrutura mucinosa, diferente do muco presente nos vertebrados, pela sua incorporação de quitina, resultando na estrutura protéica reforçada por fibras de quitina (WANG; GRANADO, 1996). Apesar destas importantes funções, as propriedades bioquímicas e de biologia molecular de formação da EP ainda não foram elucidadas.

Este estudo demonstrou que os óleos voláteis e frações de *M. foetidus* podem atuar na promoção de mudanças morfológicas no EP das larvas. Além disso, a inibição da formação do EP severamente afetou o desenvolvimento inicial das larvas. No controle a região anterior do intestino médio apresenta um EP contínuo diferente do que foi observado para a FAE e óleos voláteis. Claramente, estamos longe de elucidar completamente os mecanismos de *M. foetidus* para induzir crescimento retardado em modelos animais. No entanto, os estudos em células neoplásicas demonstraram que a FAE dos frutos é extremamente eficaz na ação antineoplásica, e que pode agir em muitas ligações de alvo molecular na célula ativando vias apoptóticas alternativas, ou induzindo a morte celular que é provocada por mitose aberrante pela ativação da caspase 3, com degradação do DNA oligonucleosomal (SALVIOLI *et al.*, 2004). Em o conjunto, todos os dados acima referidos indicam que esta espécie pode induzir a morte celular por meio de diferentes vias moleculares e com diferentes mecanismos de execução, como apoptose e catástrofe mitótica.

As alterações observadas no epitélio subperitrófico e membrana peritrófica, sugere que estes resultados estão relacionados à inibição da tripsina e quimotripsina, uma vez que estas enzimas são umas das mais importantes na digestão do alimento em *A. aegypti* e ocorrem em todas as fases do seu ciclo biológico, sendo muito expressas nas fases de larva e pupa (YANG; DAVIES, 1971; VENANCIO *et al.*, 2009).

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que ambas as espécies estudadas apresentam várias atividades biológicas, e que estas variam de acordo com a espécie e parte morfológica.

A partir desse estudo foi possível averiguar a importância no uso de mais de uma abordagem no momento de coleta. A ausência de indicação medicinal popular para a espécie *M. foetidus* demonstra a importância das observações em campo, onde aspectos como ausência de herbivoria é um fator que demonstra a presença de metabólitos secundários com atividade biológica.

Nos ensaios de atividade alelopática, ambas as espécies demonstram grande potencial para uso como herbicida natural, que podem ser utilizadas no controle e prevenção de *B. decumbens*, *I. cordifolia* e *C. argenteus*, sendo que os sintomas observados são resultados do aumento no estresse oxidativo.

O padrão de dominância de *M. foetidus* em campo pode estar associado às substâncias presentes nos óleos voláteis, uma vez que em experimentos conduzidos em casa de vegetação, a inibição no crescimento foi observada. Os óleos voláteis de *A. extraaxillaris* também atuam no controle de *B. decumbens*, pela inibição na germinação, crescimento e aumento no estresse.

Ambas as espécies em estudo possuem em sua composição metabólitos secundários de grande importância química e farmacológica, sendo a classe química dos flavonóides a mais expressiva em ambas as espécies e o isolamento dos flavonóides Catequina, Dihidrobinetina e Canferol são as primeiras substâncias identificadas nas espécies *M. foetidus* e *A. extraaxillaris*.

As espécies possuem atividade antimicrobiana e antineoplásica, com acentuada atividade para cepas de *Shigella sonnei* na FH de *A. extraaxillaris* e atividade específica para células leucêmicas para a FAE de *M. foetidus*, e que estes dados podem estar relacionados à inibição na regeneração cefálica de *D. tigrina*, pela inibição na divisão celular.

Ambas as espécies apresentaram potencial antioxidante para os diversos métodos testados e demonstram que as espécies podem ser investigadas em

estudos como inibição da xantina oxidase, além da prevenção contra danos ao DNA, sendo que estas atividades podem estar relacionadas à presença de flavonóides.

*A. extraaxillaris* e *M. foetidus* podem servir de controle para *A. aegypti*, sendo que os parâmetros aqui estabelecidos são um forte indicativo da atuação como pesticidas fisiológicos, atuando na inibição da tripsina e quimiotripsina pelo uso de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*, e acetilcolinesterase pelos óleos voláteis de *M. foetidus*, demonstrando mecanismos distintos.

Este trabalho contribui para o enriquecimento dos dados a respeito de *A. extraaxillaris* e *M. foetidus*, revelando importantes substâncias e atividades biológicas, porém, por se tratar de espécies com abundante composição química, e que ainda restam substâncias a serem identificados e testadas com relação as suas propriedades biológicas.



## REFERÊNCIAS

- ABEL, E.L.; OPP, S.M.; VERLINDE, C.L.; BAMMLER, T.K.; EATON, D.L. Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases. **Toxicology Science**, v. 80, p. 230–238, 2004.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, v.105, n.2, p.121-126, 1984.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**, (Illinois Allured - USA: Publishing), 2001.
- ADEBIYI, R.A.; ELSA, A.T.; AGAIE, B.M.; ETUK, E.U. Antinociceptive and antidepressant like effects of securidata longepedunculata root extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n.1, p. 234- 239, 2006.
- AFANAS'EV, V. L.; VLASYUK, V. V.; DODONOV, S. N.; LORENZ, H.; TEREbizh, V. Y. Astrofiz. Issled. Izv. Spets. **Astrofiz**, v. 32, p. 31- 19, 1999.
- AGGARWAL, B.; BHARAT, S.S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, n. 01, p. 1397-1421, 2006.
- AGUIAR, A.C.A.; MARQUES, M.C.M.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Polygala* L. subg. *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 81-109, 2008.
- Aguiar, A.C.A.; Aranha Filho, J.L.M.. A família Polygalaceae na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6,321-328, 2008.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v.18, p.75-81, 2002.
- AIRES, S.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n.2, p. 339- 344, 2005.
- ALI, A.; CANTRELL, CL.; BERNIER, UR.; DUKE, SO.; SCHNEIDER, JC.; AGRAMONTE, NM.; KHAN, I. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) biting deterrence: structure-activity relationship of saturated and unsaturated fatty acids. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, p. 1370- 1378, 2012.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ- ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS-BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 377–390, 2009.

ALMASSY JUNIOR, A. A. **Análise das características etnobotânicas e etnofarmacológicas de plantas medicinais na comunidade de Lavras Novas, Ouro Preto/MG**. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa, 2004. xiv. 132 f. il 29cm.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrititon Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, B.; DEL CARMEN, L.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, L.C; LOPES, P.T.M. Cancer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não-Específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. V. 28, n. 1, p. 118- 129, 2005.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS-FILHO, S.; INNECO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para a determinação da atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMAKO, K.; CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, v.35, n.3, p.497-504, 1994.

ANDRADE, C.A.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; CARVALHO, J.L.S.; ABRAHAO, W.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 13-15, 2005.

ANA- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado de Bacia Hidrográfica para o Pantanal e Bacia do Alto Paraguai ANA/GEF/PNUMA/OEA: Programa de Ações Estratégicas para o Gerenciamento Integrado do Pantanal e Bacia do Alto Paraguai: Relatório Final/Agência Nacional de Águas** — Brasília: TDA Desenho & Arte Ltda., 316p, 2013.

ANNIBALE, F.S. **Cultivo de Planárias (*Girardia tigrina*) e Ensaio de Sensibilidade com Dicromato de Potássio**. 2009, 56 f (Monografia) Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina.

ARNON, D.I. Copper and enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, v. 24, p.1-15, 1949.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania State University: Chapman & Hall, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington: Editorial Board, 1965.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 6, n. 6, p. 593- 597, 1989.

ASNER, G.P.; BEATTY, S.W. Effects of an African grass invasion on Hawaiian shrubland nitrogen biogeochemistry. **Plant & Soil**, v. 186, n. 1, p. 205-21, 1996.

BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 299–321, 1995.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v.13, n. 1, p. 29 -37, 1990.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 271-278, 1996.

BARNES, J.P.; Putnan, A.R.; Burke, B.A. & Aasen, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, P. D. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 - 123, 2006.

BARROS, M., C.; BOIA, M.; CEREJEIRA, A.; DUARTE, E.; MENDONÇA, A.; PICADO, A. M. V. A Ecotoxicologia na Avaliação da Qualidade do Ambiente. **Actas do 2.º Congresso Nacional de Engenharia do Ambiente. Associação Portuguesa de Engenheiros do Ambiente**. Maia, pp. 1-16, 1993.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 15-70, 1991.

BATES, L.S.; WALDRENR, P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water – stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, p. 271-285, 1995.

BEATTIE, K. A.; RESSLER, J.; WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W.; PFLUGMACHER, S. Comparative effects and metabolism of two microcystinas and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 219-226, 2003.

BECKER, N. Em **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht 2000, 383.

BENTLEY, M.D.; BRACKETT; S.R.; CHAPYA, A. 2-Hydroxyacetophenone: Principal Root Volatile of the East African Medicinal Plant, *Carissa edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1056–1057, 1984.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, 2003.

BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C.R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 45, pp. 169-177, 2007.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123, 130, 1999.

BLAKE, S. F. A revision of the genus *Polygala* in Mexico, Central America, and the West Indies. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, v. 47, n.1, p. 115- 122, 1916.

BLOKHIN, A. O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p.179-194, 2003.

BLUM, U.; REBBECK, J. Inhibition and recover of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 917-928, 1989.

BOADI, W.Y.; IYERE, P.A.; ADUNYAH, S.E. In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 25, p. 82–88, 2005.

BOLLE P, MASTRANGELO S, TUCCI P, EVANDRI MG. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, p. 137–141, 2004.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 30, p. 609–615, 1997.

BORGES, R.A.; CAVASIN, G.M.; SILVA, I.G.S.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E.S.F.; SILVA, H.H.G.; MARTINS, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *A. aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 91- 104, 2004.

BRANDÃO, M.; BRANDÃO, H.; LACA-BUENDIA J. P. A mata ciliar do Rio Sapucaí, município de Santa Rita do Sapucaí-MG: fitossociologia. **Daphne**, v. 8, p. 36-48. 1998.

BRANDOLT, R. R.; TIRONI, S. P.; OLIVEIRA, C.; MARKUS, C. Efeito alelopático de plantas de cobertura, na superfície ou incorporadas ao solo, no controle de picão-preto. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 7, n. 1, p. 51-67, 2010.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837- 907, 1990.

BRACHT, A.; SUZUKI- KEMMELMEIER, F.; SALGUEIRO- PAGADIGORRIA, C.L.; CONSTANTIN, J.; YAMAMOTO, N.S.; ISHII- IWAMOTO, E.L. Enzimas. In: BRACHT, A.; ISHII- IWAMOTO, E.L. **Métodos de laboratório em Bioquímica**, v.1, Manole, 2003

BRADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, 2º Ed. Brasília, 2009.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CANTERLE, L.P. **Erva- mate e atividade antioxidante**. 2005. 99 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, RS.

CARLINI, E. **Entre conhecimento popular e científico**. 2004. Disponível em <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em 31/jan./2014.

CARVALHO, J.L.S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale*, Brassicaceae**. 118 f, 2001, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná.

CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 234p.

CAYON, D.G.; LOPES, N.L.; OLIVA, M.A., SILVA, J.F. Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n.3, p. 33-40, 1990.

Cebria, F.; Nakazawa, M.; Mineta, K.; Ikeo K.; Gojobori, T.; Agata, K.. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. **Development, Growth & Differentiation**. 44, p.135–146, 2002.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G. DE; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CÉSPEDES, C.L.; UCHOA, A.; SALAZAR, J.R.; PERICH, F.; PARDO, F. Plant Growth Inhibitory Activity of *p*-Hydroxyacetophenones and Tremetones from Chilean Endemic *Baccharis* Species and Some Analogous: A Comparative Study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.08. p. 2283-2292, 2002.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)**. Norma CETESBL5.018. 25p. 1994.

CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L. Effects of paraoxon, *p*-nitrophenol, phenyl saligenin cyclic phosphate, and phenol on the rat. **Toxicology**. v.105, p. 291-304. 1995.

CHANG, S.T.; WU. J.H.; WANG, S.Y.; KANG, P.L.; YANG, N.S.; SHYUR, L.F. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 3420-3424, 2001.

CHARPENTIER, A.; FOURNIER, D. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. **Pesticides and Biochemistry Physiology**, v. 70, v. 2, p. 2001, 70- 77, 2001.

CHENG, S. H.; SHEEN, J.; GERRISH, C.; BOLWELL, G.P. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active

Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v. 503, n. 2-3, p. 185-188, 2001.

CHON, S. U.; COUTTS, J. H.; NELSON, C. J. Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. **Agronomy Journal**, v.92, p. 715-720, 2000.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, p. 609-636, 1999.

CHRISTIN, P.A.; BESNARD, G.; SAMARITANI, E.; DUVALL, M.R.; HODKINSON, T.R.; SAVOLAINEN, V.; SALAMIN, N. Oligocene CO<sub>2</sub> decline promoted C4 photosynthesis in grasses. **Current Biology**, v.18, n. 1, p. 37-43, 2008.

CHODAT, R. H. III Polygalacées. In: M. Micheli (ed.). **Contributions a la flore du Paraguay**. Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Geneve. v.30, 1889.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p.185–189, 2000.

CIRIO, G.M.; DONI- FILHO, L.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v. 4, p. 67-76, 2003.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental Molecular Mutagenic**, v. 29, p. 277–288, 1997.

COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARACHO, G.S. Flora da Paraíba, Brasil: Polygala L. (Polygalaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, p. 225-239, 2008.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Inflammation and repair. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. (ed) **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994.

CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S. & BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 590-595, 1997.

CORTIGLIA, F.; LOY, G.; GARAU, D.; FLORIS, C.; CASU, M.; POMPEI, R.; BONSIGNORE, L. - Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 302-5, 2001.

COUTINHO, L. M. O conceito de Bioma. **Acta Botânica Brasileira**, v.20, n. 2, p. 13-23, 2006.

D'ANTONIO, C.M.; MEYERSON, A. Exotic plant species as problems and solutions in ecological restoration: a synthesis. **Restoration Ecology**, v. 10, n.2, p. 703-713, 2002.

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G & DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26 n. 9, p.2079-2093, 2000.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neurosciences Method**, v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.

DE FEUDIS, F.V.; PAPADOPOULOS, V.; DRIEU, K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. **Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n.2, p.405- 417, 2003.

DELACHIAVE, M.E.A.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D., Efeitos alelopáticos de grama-seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, 194-197 p. 1999.

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V. J.; BERRY, C.; CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A; LEROUX, C. N. **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 2000.

DEL MORAL, R.; WILLIS, R.J.; ASHTON, D.H. Suppression of coastal heath vegetation by *Eucalyptus baxteri*. **Australian Journal of Botany**, v. 26, p. 203-219, 1978.

DEMPKE, W.; RIE, C.; SCHMOLL, A.G.H. Cyclooxygenase-2: a novel target for câncer quimotherapy?. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n. 127, p 411-417, 2001.

De Lorenzo, M.E.; Scott, G.I.; Ross, P.E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 84– 98, 2001.

DE WIT, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, n. 2, p. 2726-2732, 2007.

DIARRA, A.; SMITH JR., R.J.; TALBERT, R.E. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. **Weed Science**, Champaign, v.33, n.3, p.310-314, 1985.

DING, G.; LIU Y.; WANG W. Allogeneic perodontal ligament stem cell therapy for periodontitis. **Swine cells**, v. 28, p. 1829-1838, 2010.



DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1087, 1995.

DOBIN, J.A.; GADELHA, M.I.P. Mesilato de imatinibe para tratamento da leukemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 03, p. 429- 438, 2002.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47- 85, 2002.

DUARTE, F.S.; MARDER, M.; HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; LIMA, T.C.M. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, v.197, p. 351-360, 2008.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999.

DUKE, S.O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. P In: S.O. Duke (ed.). **Weed Physiology**. Vol. II. Boca Raton, CRC Press, 1985.

DUKE, S.O. & ABBAS, H.K. Natural products with potential use as herbicides. In: NARWAL, S.S. & TAURO, P. **Allelopathy in pest management for sustainable agriculture**. Scientific publisher. Jodhpur, India, 1996.

DUKE, S.O., SCHEFFLER, B.E., DAYAN, F.E. Allelochemicals as herbicides. **First European Allelopathy Symposium**. Vigo, Spain. p. 47-59, 2001.

DUKE, S.O., RIMANDO, A.M., BAERSON, S.R., SCHEFFLER, B.E., OTA, E. Strategies for the use of Natural Products for Weed Management. **Journal of Pesticide Science**. v. 27, p. 298-306, 2002.

EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. Pp. 171-188. In: A.R. Putnam & C.H.-S. Tang (eds.). **The Science of Allelopathy**. Nova York, John Wiley and Sons, 1986.

EINHELLIG, F.A. The physiology of allelochemical action: Clues and Viewa. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. (Ed.). **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo: Universidade de Vigo, p.1-23, 2002.

EL-GHAMERY, A.A.; EL-NAHAS, A.I.; MANSOUR, M.M. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Cytologia**. v. 65, p. 277- 287, 2000.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, J.R.V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v. 7, p.88–95, 1961.

ERIKSEN, B. Phylogeny of the polygalaceae and its taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 186, n. 3, p. 33-55, 1993.

ESCALANTE-PÉREZ, M. *et al.* Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus x canescens*). **Planta**. v. 229, n. 2, p. 299-309, 2009.

ESTERBAUER, H., LANG, J.; ZADRAVEC, S.; SLATER, T.F. Detection of malonaldehyde high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymology**, v.105, p.319- 328, 1984.

EU, J.P.; LIU, L.; ZENG, M.; STAMLER, J. S. An apoptotic model for nitrosative stress. **Biochemistry**, v. 39, p. 1040 – 1047, 2000.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. *et al* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003.

Farmacopéia brasileira 5 ed., vol. 1, Brasília: ANVISA; 2010.

FELFILI, J. M.; CARVALHO, F. A.; HAIDAR, R. F. **Manual para o monitoramento de parcelas permanentes nos biomas Cerrado e Pantanal**. Brasília: UNB, 2005.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v.2 05, n.3, p.223-240. 2004.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88,p. 252–259, 2007.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Interpretação de resultados de germinação In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (eds). **Germinação do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 209-222, 2004.

FESSENDEN, R. J.; **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres. 1982.

FEUSSNER, G.; KURTH, B.; LOHRMANN, J. Comparative effects of bezafibrate and micronised fenofibrate in patients with type III hyperlipoproteinemia. **European Journal Medical Research**, v. 21, n. 2, p. 165- 168, 1997.

FIRBANK, L.G.; WATKINSON, A.R. On the analysis of competition within two-species mixtures of plants. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, n.2, v.22, p.503-517, 1985.

FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.

FISKESJO, G. **The Allium-test as standard in environmental monitoring**. Hered. v. p. 102 99–112., 1985.

FISCHER, R.A.; MILES, R.E. The role of spatial pattern in the competition between crop plants and weeds. A theoretical analysis. **Mathematical Biosciences**, New York, v.18, p.335-350, 1973.

FOREST F., CHASE, M. W., PERSSON, C., CRANE, P. R.; HAWKINS, J. A. The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant-dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). **Evolution**, v. 61, n. 1, p. 1675 – 1694, 2007.

FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21–25, 1976.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, -. 137- 147, 1999.

FRESHNEY IR. Culture of animal cells. **A manual of Basic Technique**. 3<sup>o</sup> ed. New York, Wiley-Liss, 1994.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, J; GALILI. G., (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 629-644 p., 1995.

FUJII, Y.; PARVEZ, S.R.; PARVEZ, M.M.; OHMAE, Y.; IIDA, O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. **Weed Biology and Management**. v.3, p. 233-241, 2003.

FUJII, Y.; SHIBUYA, T., NAKATANI, K., ITANI, T., HIRADATE, S., PARVEZ, M. M. Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. **Weed Biology and Management**, v. 4: p. 19-23, 2004.

FUKUNAGA, K., TAKAMA, K., SUZUKI, T. High performance liquid chromatography determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. **Analitical Biochemistry**, v. 230, n. 2, p.20-23, 1995.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B. Analysis of própolis from *Bacharis dracunculifolia* DC (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, n. 111, p.206-212, 2007.

FURNESS, S.H.; STAFFORD, P.J. Polygalaceae. **Review of palaeobotany and palynology**, v.88, n. 3, p.61-82, 1995.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug Discovery. **Current Opinion in chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; SANTANA, A.L.B.D.; ALVES, M.M.; MATOS, M.F.C. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Teminalia fagifolia*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1223-1228, 2006.

GAYOSO, C.; POMAR, F.; MERINO, F.; BERNAL, M. A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. **Scientia Horticulturae**, v. 102, p. 1-13, 2004.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 32, n. 12, p. 1264 – 1275, 2002.

GNIAZDOWSKA, A.; R. BOGATEK. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2009.

GOMES-JÚNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P. LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1330-1337, 2006.

GOPAL, R.M.; MISHRA, R.K.; CJAUDHARY, S.; ANDEY, R.; GUPTA, S.; KUMAR, S. 2-Hydroxyacetophenone, the Main Component of the Essential Oil of the Roots of *Carissa opaca* Stapf ex Haines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n.5, p. 385- 387, 2009.

GUECHEVA, T.N.; ERDTMANN, B.; BENFATO, M.S. AND HENRIQUESA, J.A.P. Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia*

(*Girardia*) *schubarti* exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 351–357, 2003.

GUNEYLI, E.; BURNSIDE, O.C.; NORDQUIST P.T. Influence of seedling characteristics on weed competitive ability of sorghum hybrids and inbred lines. **Crop Science**, Madison, v.9, n.6, p.713-716, 1969.

GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLÜ, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p.371-382, 2003.

GUSMAN, G.S.; BITTENCOURT, A.H.C.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n.01, p.119-125, 2008.

GYAMFI, M.A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology**, v. 32, p. 661-667, 1999.

HALDAR, K.; GAITSKELL, K.; BRYANT, A.; NICUM, S.; KEHOE, S.; MORRISON, J. Epidermal growth factor receptor blockers for the treatment of ovarian cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, p. 113- 139, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Formation of a thiobarbituric-acidreactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEB Letters**. v. 128, p. 347–352, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyrrribose method: A simple “test- tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, n. 1, 215- 219, 1987.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. **The Faseb Journal**, v.1, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 33, n. 7, p. 601- 617, 1995.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. Oxford University Press: New York, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vitro* studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *In press*, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n. 6, p. 985. 1999.

HAO, J.H., DONG, C.J., ZHANG, Z.G., WANG, X.L., SHANG, Q.M. Insights into salicylic acid responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons based on a comparative proteomic analysis. **Plant Science**, v. 187, p. 69-82, 2012.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** **55**(6): 481-504, 2000.

HARTBERG, W.K.; CRAIG-JR, G.B. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution**, v. 24: p. 692-703, 1970.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HENSLEY, K., ROBINSON, K. A., GABBITA, S.P., SALSMAN, S.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury Free Radical Biology & Medicine, v. 28, p. 1456 – 1462, 2002.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n.2, p. 89- 143, 2003.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chemical Toxicology**, v.37, p.937- 942, 1999.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377- 378, 2007.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A.; Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2090-2095, 2009.

HUA-MING, C. et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soyabean protein. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2619-2623, 1996.

HUGHES, F.; VITOUSEK, P.M.; TUNISON, T. Alien grass invasion and fire in the seasonal submontane zone of Hawaii. **Ecology**, v. 72, p. 743-746, 1991.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapas de Biomas do Brasil: Primeira aproximação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

INDERJIT & DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy, **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.

INOUE, T.; KUMAMOTO, H.; OKAMOTO, K.; UMESONO, Y.; SAKAI, M.; SÁNCHEZ ALVARADO, A. & AGATA, K. Morphological and Functional Recovery of the Planarian Photosensing System during Head Regeneration. **Zoological Science**, v. 21, n.2, p. 275-283. 2004.

ISENGARD, H.D.; FÄRBER, J.M. Hidden parameters of infrared drying for determining low water contents in instant powders. **Talanta**, v.50, n.2, p. 239-246, 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **Animal and vegetable fats and oils preparation of methyl esters of fatty acids**. Geneve: ISO. Method ISO 5509, 1978.

INZE, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, p. 33-8, 2004.

JAMAL, A.G; HANSEN. S.; JULU, P.O.O. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, v. 181-182, n. 48, p. 23-33, 2002.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, n. 1, p.515-540, 1990.

JOHNSON, M.K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutat Research**, v. 459, p. 211– 218, 2000.

JOHNSON, J.T. Prevention of radiation- induced mucositis. **Head and Neck Cancers**, v. 3, n. 1, p. 56-58, 2001.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v.166, p. 139-160, 2001.

JUNAID, S.A.; ABUBAKAR, A.; OFODILE, A.C.; OLOBODE, A.O.; ECHEONWU, G.O.N.; OKWORI, A.E.J.; ADETUNJI, J.A. Evalution of Securidata longipendunculata leaf and root extracts for antimicrobial activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 3, p. 322-325, 2008.

JUAN JIMÉNES-OZORNIO, F.M.V.Z.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C., Allelopathic activity of *Chonopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, 195-205 p., 1996.

JUNGHANS, U. *et al.* Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. **Plant Cell Environment**, v. 29, n. 8, p. 1519-1531, 2006.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 332p

KARCZMAR, A. Invited review: Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. **Neurochemistry International**, v. 32, n. 5-6, p. 401- 411, 1998.

KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005.

KAWASHIMA, K.; MIYAKO, D.; ISHINO, Y.; MAKINO, T.; SAITO, K.; KANO, Y. Anti-stress effects of ,3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biological Pharmacy Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1317-1379, 2004.

KELLER, J. N.; LAUDERBACK, C. M.; BUTTERFIELD, D. A.; KINDY, M. S.; MARKESBERY, W. R. Amyloid-beta peptide effects on synaptosomes from Apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 1579–1586, 2000.

KERN, K.A.; PERGO, E.M.; KAGAMI, F.L.; ARRAES, L.S.; SERT, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 47, n. 11-12, p. 1095-1101, 2009.

KIDD, H.; JAMES, D.R. (editors). The Agrochemicals Handbook. 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services. 1991.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **Journal Food Science**. v. 58, p.1407-1410, 1993.

KOVAČEVIĆ, G.; GREGOROVIĆ, G.; KALAFATIĆ, M. & JAKLINOVIĆ, I. The Effect of Aluminium on the Planarian Polycelis felina (Daly.). **Water Air Soil Pollut.** v. 196, p. 333-344, 2009.

KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Planta Daninha**, v. 24, p. 579-587, 2006.

KUJALA, T.S.; LOPONEN, J.M.; KLIKA, K.D.; PIHLAJA, K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold



storage on the content of total phenolics and three individual compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5338-5342, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, AK.; FAUSTO, N.; ROBBINS, C. **Patologia - bases Patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005.

KYUNGMI, M, S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 96-104, 2008.

LABORIAU, L.G. **A Germinação das Sementes**. Secretaria geral da organização dos Estados Americanos. Washington D.C, Estados Unidos. 1983.

LALL, N.; MEYER, J.J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 3, p. 347-354, 1999.

LANE, N.; WEIDENHAMER, J.D.; ROMEO, J.T. *Zapoteca formosa*: sulfur chemistry and phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 2, p. 425- 437, 2004.

LAPA, F.R.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C..H.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R., MARQUES, M.C. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1413- 1419, 2007.

LAPA, F.R.; GADOTTI, V.M.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; MARQUES, M.C; DAFRÉ, A.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 306-315, 2009.

LARA JFR., MACEDO, JF.; Brandão M. Plantas daninhas em pastagens de várzeas no Estado de Minas Gerais. **Planta Daninha**, 21, p. 11-20, 2003.

LAUTRAITE, S.; MUSONDA, A.C.; DOEHMER, J.; EDWARDS, G.O.; CHIPMAN, J.K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. **Mutagen**, v.17, p. 45– 53, 2002.

LEATHER, G.R.; EINHELLIG, F.A. Bioassays in the study of allelopathy. IN: PUTNAN, A.R.; TANG, C.S. **The Science of Allelopathy**. John Wiley and sons: New York, 1986.

LEE, V.Y., MCCLINTOCK, D.S., SANTORE, M.T.; G.R.S. Nitric Oxide Induces Cell Death by Regulating Anti-Apoptotic BCL-2 Family Members. **The Journal of Biological Chemistry**. v.18, p 16067 – 16074, 2002.

LEFEVRE, A. M. C.; LEFEVRE, F.; SCANDAR, S. A. S.; YASUMARO, S.; SAMPAIO, S. M. P. Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 353- 359, 2003.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise Histórica. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a Óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Agros, 2001.

LIMA, J.B.; PEREIRA DA CUNHA, M.; CARNEIRO DA SILVA, R.; GALARDO, A.K.R.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A.; RAMOS, R.P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.68, p. 329-33, 2003.

LIMA, S. G. V.; LIMA, A. F.; DONAZZOLO, J. L. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS. *Rev. Bras. Agroecologia*, v. 2, n. 1, 2007.

LIMA, B.; AGUERO, M.B.; ZIGADLO, J.; TAPIA, A.; SOLIS, C.; ARIAS, A.R.; YALUFF, G.; ZACCHINO, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA- HIRSCHMANN, G. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 1, p. 68-72, 2009.

LIN, J.Y.; TANG, C.Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v.101, p.140-147, 2007.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R. SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; DI BERARDINO D.; URSINI, M.V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 39–46, 1998.

LISCOVITCH, M.; RAVID, D. A case study in misidentification of câncer cell lines: MCF-7/ AdrR cells (re- designated NCI/ADR- RES) are derived from OVCAR- 8 human ovarian carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 245, p. 350-352, 2007.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Anti microbial activity and anti complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, n.1, p. 23–32, 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUDTKE, R.; AGUIAR, A. C. A. Nota sobre a ocorrência de pétalas reduzidas em espécies de *Polygala* L. subgênero *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) da Região Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, 2008.

LUNA, J. E. D., MARTINS, M.F. ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.; SILVA, M.A.N. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

SALES MP, XAVIER-FILHO J. Vicillins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Compdus Biochemistry Physic C.* v. 105, p. 89-94, 1993

MACEDO, M.L.R.; DE SA, C.M.; FREIRE, M.D.G. M.; PARRA, J. R. P. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L.seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 2533-2540, 2004.

MACEDO, M.L.R.; DURIGAN, R.A.; SILVA, D.S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry & Physiology**, v. 73, p. 213–231, 2010.

MACIAS, F.A. Allelopathy in search for natural herbicide models. In: NARWAL, S.S. & TAURO, P. **Allelopathy in Pest Management for Sustainable Agriculture**. Scientific publisher. Jodhpur, India, p. 310-329, 1996.

MACIAS, F.A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIAS, A.F.; FERNANDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A. & ALVES, P.L.C.A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795-800, 2006.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2917-2936, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO A.C.; VEIGA JR.. V. F. GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**. v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MACORIS, M. L. G.; ANGRIGHETTI, M. T. M.; GLASSER, C. M.; GARBELOTI, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 521- 522, 1999.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, p.176-177, 1962.

MAIA-NETO, M.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia ungulata* L. **Biochemica Systematics and Ecology**, v. 36, n. 3, p. 227-229, 2008.

MAJEWSKA, A.M.; FURMANOWA, M.; SLIWINSKA, E.; GLOWNIAK, K.; GUZEWSKA, J.; KURÁS, M.; ZOBEL, A. Influence of extracts from shoots of *Taxus baccata* var. *elegantissima* on mitotic activity of meristematic cells of *Allium cepa* L. roots. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.69. p.185-192, 2000.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MALTERUD, K.E.; FARBROT, T.L.; HUSE, A.E.; SUND, R.B. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 77-85, 1993.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efecto mitótico y genotóxico Del cadmio em poblaciones meristemáticas de *allium cepa* L. (cebola). **Ciencia**, v. 6, p. 93- 99, p. 1998.

MCLAUGHLIN, J.; CHANG, C.; SMITH, D.; Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in Natural Productus Chemistry**, v. 9, p. 388-409, 1991.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZEIM, M.; OLIVEIRA, D. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.

MARIZ, G., **Contribuição ao estudo ecológico e farmacognóstico de quatro plantas características da zona da caatinga** (*Zizyphus juazeiro* Mart., *Maytenus rígida* Mart., *Spondias tuberora* Arr. Cam., *Amburana cearensis* (Fr. All.) Smith), 1953, 418f, Tese (Doutorado em Ecologia)- Universidade de Recife, Recife.

MARQUES, M.C.M. 1979. Revisão das espécies do gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) do Estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v.31, n. 48, p. 69-339, 1979.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J, Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.30, n.5, p.1431-1433, 1991.

MATOS, M.F.C.; LEITE, L.I.S.P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J.M.; CAROLLO, C.A.; HOELLMAN, A.R.; PEREIRA, N.F.G.; SILVA, D.B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v. 77, n.3, p. 227- 2292, 2006.

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia – importância e suas aplicações. **Horti Sul**. v.1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; BEECHER, G.R. Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v.91, p.571-577, 2005.

MEDVEDEV, I.V. Regeneration in two freshwater planarian species exposed to methylmercury compounds. **Ontogenez**, v. 39, n. 4, p. 289-293, 2008.

MEIJA, E. G.; SONG, Y. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Illex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MELO-SANTOS, M.A.V., VARJAL-MELO, J.J.M., ARAÚJO, A.P., GOMES T.C.S., PAIVA, M.H.S., REGIS, L.N., FURTADO, A.F., MAGALHÃES, T., MACORIS, M.L.G., ANDRIGHETTI, M.T.M., AYRES, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, pp. 180 –189, 2010.

MELOS, J. L. R. et al. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). **Química Nova**. 2007, vol.30, n.2, pp. 292-297.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEOTTI, F.C.; ARDENGHI, J.V. PRETTO, J.B. SOUZA, M.M.; DÁVILA MOURA, J.; JUNIOR, A.C.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl- 2- pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 107-112, 2006.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31- 34, 1982.

MEYER, J.J.M. RAKUAMBO, N.C.; HUSSEIN, A. A Novel xanthones from *Securidaca longepedunculata* with activity against erectile dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 599- 603, 2008.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673–751, 2000.

MILIAUSKAS, G.; P.R. VENSKUTONIS; T.A. VAN BEKK. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 24, n.10, 2003.

MIMS, C. C; PLAYFAIR, J; ROITT; WAKELIN, D; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2ed. São Paulo: Manole, 1999.

MIHARA, R.; BARRY, K.M.; MOHAMMED, C.L.; MITSUNAGA, T. Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* heartwood extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31p. 789-804, 2005.

MIRON, T.; MIRONCHIK, M.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. Inhibition of tumor growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery. **Molecular Cancer Therapy**, v. 2, n. 12, p. 1295-1301, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.P.R.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugar cane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218 -229, 2007.

MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**. v. 26, n. 2, p. 211- 219, 2004.

MONTEIRO, C. A.; VIEIRA, E. L. Substâncias alelopáticas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: EDUEM, 2002.

MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochimica Biophysica Acta**. v, 23, n. 1059, p. 121–140, 1991.

MORAGA, S.P.; ESCOBAR, R.; VALENZUELA, A.S. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globules* Labill subspecies. **Electronic Journal Biotechnology**, v.9, p. 310- 314, 2006.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Evaluation of the genotoxic potential of municipal waste water discharged into the Paraguay river during periods of flood and drought. **Environmental Toxicology**, v. 16, p. 113- 116, 2001.

MORAIS, S.M., CATUNDA- JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.R.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Cróton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1381-1387, 2000.

MURUGAN, K.; JEYABALAN, D. Mosquitocidal effect of certain plants extracts on *Anophels stephensi*. **Current Science**, v. 76 p. 631–633, 1999.

MOTSEI, M.L.; LINDSAY, K.L.; VAN STADEN, J.; JAGER, A.K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p. 235-241, 2003.

MYHRSTAD, M.C.; CARLSEN, H.; NORDSTRO, M.O.; BLOMHOFF, R.; MOSKAUG, J.Ø. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the g-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p.386– 393, 2002.

NASCIMENTO, G. G. F; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. Antibacterial activity off plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bactéria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n.2, p. 247-256, 2000.

NAGAI, T. et al. Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as affective adjuvants for nasal influenza and diphtheria-pertussis-tetanus vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 32, p. 4824-4834, 2001.

NAGULENDRAN, K.R., S. VELAVAN, R. MAHESH, S.V.R. & HAZEENA BEGUM, V.H. *In vitro* antioxidant activity and total polyphenolic and content of *Cyperus rotundus* Rhizomes. **E-Journal of Chemistry**. v. 4, n. 3, p. 440-445, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A. Wayne, PA, USA: NCCLS. 1997.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal Experimental of Botany**. v. 54, p. 1931-1939, 2003.

NEU, R. A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, v. 43, p. 82, 1956.

NEVES, G. Y. S. **Estresse salino e seus efeitos na lignificação de raízes de soja**. 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 23, n. 3, p\_. 311-335, 2012.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

NI, H.; MOODY, K.; ROBLES, R.P.; PALLER JÚNIOR, E.C.; LALLES, J.S. *et al.* *Oryza sativa* plant traits conferring competitive ability against weeds. **Weed Science**, Lawrence, v.48, n.2, p.200-204, 2000.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, p. 503–515, 2010.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1931-1939, 2003.

NOLAN, R.C.; HO, T.D. Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase expression in barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, v.88, p.588 -93, 1988.

NORIEGA, F. WELLS, M. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**. 45. p. 613-620, 1999.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 3, n, 1, p. 114- 122, 1997.

OJALA, T.; VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; VUOPRELA, H.; HILTUNEM, R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phytotoxicity of plant coumarins. **Planta medica**, v. 65, n. 8, p. 715-718, 1999.

OKUSHIO, K.; MATSUMOTO, N.; KOHRI, T.; SUZUKI, M.; NANJO, F.; HARA, Y. Absorption of tea catechins into rat portal vein. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 326-329, 1996.

OLIVEIRA, M.D. **Introdução de espécies: uma das maiores causas de perda de biodiversidade**. Corumbá MS: Embrapa Pantanal, 2004.

OLIVEIRA, A.S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R.O.; RIBEIRO, J.K.C.; MACEDO, L.L.P.; ANDRADE, L.B.S.; BEMQUERER, M.P.; SANTOS, E.A.; KIYOTA, S.; SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests." **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-856, 2007.

OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 93-105, 2007.

OLIVEIRA, L. S. T.; CUNHA E SILVA, S. L.; TAVARES, D. C.; SANTOS, A.V.S.; OLIVEIRA, G. C. B. Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 5, n. 8, 2009.

OLIVEIRA, M. D. M.; NASCIMENTO, L. C.; URSULINO, A. E.; GONÇALVES, E. P.; GUEDES, R. S.; NETO, J. J.S. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith submetidas à termoterapia e tratamento químico. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n.1, p. 22- 28, 2011.



OKAWA, M.; KINJO, J.; NOHARA, T.; ONO, M. DPPH• (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 24, n.10, p. 1202-1205. 2001.

O'KENNEDY R, THORNES, R. D.; **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey. 1997.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**, Washington, DC: OPS, 1995.

PADILHA, S.; WILSON, V. Z.; BUSHNELL, P. J. Studies on the correlation between blood cholinesterase inhibition and 'target tissue' inhibition in pesticide-treated rats. **Toxicology**, v. 92, n. 1-3, p. 11-25, 1994.

PAIVA, J. A. R. Polygalarum Africanarum et Madagascariensium prodromus atque gerontogaei generis Heterosamara Kuntze, a genere Polygala L. segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. **Fontqueria**, v. 50, n. 1, p. 1- 346, 1998.

PAIVA, S. R. de; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 76, n.3, p. 499-504, 2004.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine: International Journal of Phytoterapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAUL, A.; HARRINGTON, L.C.; SCOTT, J.G. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. V. 43, n. 1, p. 55- 60, 2006.

PASTORE, J. F. B.; ABBOTT, J. R. Taxonomic notes and new combinations for *Asemeia* (Polygalaceae). **Kew Bulletin** v. 67, n. 1, p. 801 - 813, 2012.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; DEL RÍO, L.A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.

PANDEY, D.K.; MISHRA, N. & SINGH, P. Relative phytotoxicity of hydroquinone on rice (*Oryza sativa* L.) and aquatic weed green musk chara (*Chara zeylanica* Willd). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 83, n 2, p, 82- 96, 2005.

PARK, H.K.; KIM, T.B.; KANG, H.R.; CHANG, Y.S.; KIM, Y.K.; CHO, S.H.; MIN, K.U.; KIM, Y.Y. Occupational asthma and rhinitis induced by a herbal medicine, Wonji (*Polygala tenuifolia*). **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, p. 46-49, 2005.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more function than a Swiss army knife, **Plant Cell Report**, v. 24, p. 255–265, 2005.

PATEL, R.P.; BOERSMA, B.J.; CRAWFORD, J.H.; HOGG, N.; KIRK M.; KALYANARAMAN, B.; PARKS, D.A.; BARNES, S.; DARLEY-USMAR, V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1570 – 1581, 2001.

PEDROL, N.; GONZALEZ, L.; REIGOSA, M. J. Allelopathy and abiotic stress. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZALEZ, L. (Eds). **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Dordrecht: Springer, 2006.

PEGGS, K.; MACKINNON, S. Imatinib Mesylate: the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n 11, p. 1048- 1050, 2003.

PERGO, E.M.; ABRAHIM, D.; SOARES, D.A.; SILVA, P.C.; KERN, K.A.; DA SILVA, L.J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E.L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 4, p. 499, 507, 2008.

PERGO, E.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 500-513, 2011.

PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e crescimento de *lactuca sativa* e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 425- 430, 2004.

PERSSON, C. Phylogenetic relationships in the Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the trnL–F region. **Taxon**, v. 50, n.1, p. 763 – 779, 2001.

PETERS, W. **Peritrophic Membranes. Zoophysiology**, Springer, Berlin, Germany, 1992.

PIMENTEL, C. Relações hídricas em dois híbridos de milho sob dois ciclos de deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 2021-2027, 1999.

PIÑA-RODRIGUEZ, F. C. M., FIGLIOLIA, M. B., PEIXOTO, M. C. Testes de Qualidade. In: A. G. FERREIRA & F. BORGHETTI. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed. Artmed. p. 251-262, 2004.

PINHEIRO, T.R.; CECHINEL,V. SANTOS A.R.S; CAXLITO, J.B.; DELLE MONACHE, F. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 725-728, 1998.

PIONTEK, M. Application of *Dugesia tigrina* Girard in toxicological studies of aquatic environments. **Polskie Archiwum Hydrobiologii**. v. 45, n. 4, p. 565-572, 1998.

PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA- FILHO, I.A.; OLIVEIRA, Jr, R.S.; FARIA, T.C.L. Atividade alelopática de leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 01, p. 61-65, 2001.

PIZZOLATTI, M. G, LUCIANO, C, MONACHE, F. D. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 819-22, 2000.

PIZZOLATTI, M.G. CRISTIANO, R.; MONACHE, F.D.; BRANCO, A. Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2002.

PIZZOLATTI, M. G., MENDES, B.G.; CUNHA, A.; SOLDI, C.;KOGA, A.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 177-182, 2008.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p.1-11, 2007.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis*. Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 813- 816, 2003.

PORTA, H.; ROCHA- SOSA, M. Plant Lipxygenases. Physiological and Molecular Features. **Plant Physiology**, v. 130,p. 15–21, 2006.

POTT, A; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá: EMBRAPA – SPI, 1994.

POTT, A.; SILVA, J. V.; ABDON, M.; POTT, V. J.; RODRIGUES, L. M.; SALIS, S. M.; HATSCHBACH, G. G. Vegetação. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) - PCBAP**. Diagnóstico dos meios físicos e bióticos: meio biótico. Brasília, v. 2, DF: MMA, 1997.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRESI, N.M.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 909-914, 2000.

PRASA, E.R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman–Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 80–88, 2010.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n.5, p. 337-341, 1999.

PROMSIRI, S.; NAKSATHIT, A.; KRUATRACHUE, M.; THAVARA, U. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. **Insect Science**, v. 13, p. 179–188, 2006.

PUTNAM, A.R. **Weed Allelopathy**, p.131-155, 1985.

PUTTER, J. Peroxidase. In: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie: Weinhan, 1974.

QUIRIOS. Disponível em: <http://www.quirios.com.br/Produto/PDF/MOLIBDATO%20DE%20AMONIO.pdf>. Data de acesso: 12/07/2013.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; MILRAD, D.E.; FORCHETTI, S.; TIGIER, H.; TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRAND, D.F.; GRIMES, H.D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **The Plant Cell**, v. 3, p. 973–987, 1991.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; ROS, BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; DE FORCHETTI, S.M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1119-1127, 2000.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**. 2.ed. New York : Wiley, 1997.

RAHUMAN, A.A.; VENKATESAN, P. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. **Parasitology Research**, v.103, n. 133–139, 2008.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

RAMIREZ-MAREZ, M.V.; CHANDRA, S.; DE MEIJA, E.G. *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutant Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

RAMOS, S.; ALIA, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (Hep G<sub>2</sub>). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1271–1280, 2005.

RAMOS, V.S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P.; MACEDO, M.L.R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 255-261, 2009.

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n.1, p. 1-11, 2006.

Rang HP, Ritter JM, Dale MM. In: **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 904p.

RAO, M.S.; RAMAN, N.V. A novel flavonoid from *Polygala chinensis*. **Biochemistry Systematic Ecology**, v. 32, n. 4, p. 447-448, 2004.

REDDIEN, P.W. & SÁNCHEZ ALVARADO, A. Fundamentals of Planarian Regeneration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 725 – 757, 2004.

REGNAULT-ROGER, C.M.; RIBODEAU, A.; HAMRAOUI, I.; BAREAU, P.; BLANCHARD, M.; GIL-MUNOZ, F.T.; BARBERAN, F. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Products Research**, v. 40, p. 395-408, 2004.

REIGOSA, M.J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; DE LA PEÑA, T.C. REIGOSA, R.M.J. Cell cycle analyses for understanding growth inhibition. in: REIGOSA, M.J.; PEDROL, N. (eds.) **Allelopathy**, v.1. Springer, the Netherlands, 2006.

REIS, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 39, n. 4, 577-586, 2006.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*, v. 344, p.41–54,1995.

RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; NASCIMENTO, F.P.; JACQUES, A.V.; DAFRE, A.L.; RODRIGUES, A.R. ANTINOCEPTIVE EFFECT OF THE *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & toxicology**, v. 103, p. 43-47, 2008.

RIBEIRO, V. V. Efeitos de Fungicidas e Produtos Naturais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em sementes de CAUPI. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

RICE, L. **Allelopathy**, Academic Press: Londres, 1984.

RICE-EVANS, C.A. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? **Biochemical Society Symposium**, v. 61, p. 103-116, 1995.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 797-807, 2001.

RODRIGUEZ-CONCEPTION, M.; GÓMEZ, M.D.; BELTRAN, J.P. Repression of the pea lipoxygenase gene *lox* is associated with carpel development. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p.887–899, 1995.

RODRIGUES, C. A. G.; CRISPIM, S. M. A.; COMASTRI FILHO, J. A. **Queima controlada no Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2013. disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC35.pdf>. Acesso em 23/06/2013.

ROGISNKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain- breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235, 254, 2005.

ROLIM DE ALMEIDA, L. F.; DELACHIAVE, M. E.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; MANCINI, E.; FEO, V. *In vitro* allelopathic potential of *Leonurus sibiricus* L. leaves. Department of Botany, Sao Paulo State University, Sao Paulo, Brazil. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, n. 1, p. 39-48, 2008.

ROMAN, E.S. et al. Modeling germination and seedling elongation of common lambsquarters (*Chenopodium album*). **Weed Science**, Lawrence, v.47, n.1, p.149-155, 1999.

RUCH, R. J.; CHENG, S. J.; KLAUNIG, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. **Carcinogenesis**. v. 10, p.1003–1008, 1989.

SAITO, Y.; SHIGA, A.; YODHIDA, Y.; FURUHASHI, T.; FUJITA, Y.; NIKI, E. Effects of a novel gaseous antioxidative system containing a rosemary extract on the oxidation induced by nitrogen dioxide and ultraviolet radiation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 68, n. 4, p. 781-786, 2004.

SALEEM, A.; AHOTUPA, M.; PIHLAYA, K. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56, p. 973-978, 2001.

SALVIOLI, S.; SIKORA, E.; COOPER, E. L.; FRANCESCHI, C. Curcumin in cell death processes: a challenge for CAM of age-related pathologies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 2, pp. 181–190, 2007.

SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTOS, E. M. A.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M.; MENEZES, E. A. & SANTAELLA, S. T. Pós-tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v.1, p.73-81, 2004.

SÁNCHEZ, C.; GUPTA, M.; VASQUEZ, M.; DE NORIEGA, Y. M.; MONTENEGRO, G. Bioassay with brine *Artemia* to predict antibacterial and pharmacologic activity. **Revista medica de Panama**, v. 18, p. 62-69, 1993.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121, 2002.

SANDERSON, J.T.; SEINEN, W.; GIESY, J.P.; VAN DEN BERG, M. 2-Chloro-striazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicology Science*, v. 54, p.121–127, 2000.

SANTOS, S.; REZENDE, M.O.O. Avaliação do potencial herbicida de compostos secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens. **Revista Analytica**, v. 2, n. 32, p. 72-74, 2008.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, 1998.

SCALBERT, A.; Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883. 1991.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHAECHTER, M; ENGLEBERG, N. C; EISENSTEN, B. I; MEDOFF, G. **Microbiologia Mecanismos da Doença Infecciosa**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHERER, L. M.; ZUCARELI, V.; ZUCARELI, C. A.; FORTES, A. M. T. Efeito alelopático do extrato aquoso de folha e de fruto de leucena (*leucaena leucocephala* Wit) espécies invasoras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 153-158, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ARIAS, A.R. A screening method for natural products on triatomine bugs. **Phytotherapia Research**, v. 6, n. 2, p. 68-73, 1992.

SCHMITZ, W.; SAITO, Y.A.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, O.H. Gren tea as a chemoprotecto. **Ciências Biológicas e da Saúde**, V. 26, n.2, p. 119- 130, 2005.

SCHULZ, A.; WENGENMAYER, F.; GOODMAN, H.M. Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. *Plant Science*, v. 9, p. 1–15, 1990.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SCHMIDT-SILVA, V.; PAWLOWSKI, A.; SANTOS, E. K.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 681- 699, 2011.

SCHROEDER, J.A.; ADRIANCE, M.C.; THOMPSON, M.C.; CAMENISCH, T.D.; GENDLER, S.J. MUC<sub>1</sub> alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. **Oncogene**, v. 6, n. 22, p. 1324- 1323, 2003.

SHURTLEFF, J.L.; COBLE, H.D. The interaction of soybean (*Glycine max*) and five weed species in the greenhouse. **Weed Science**, Champaign, v.33, n.5, p.669-672, 1985.

SEITENFUS, A. L. R. & LEAL-ZANCHET, A. M. Uma introdução à morfologia e taxonomia de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.26, n.1, p. 187-202, 2004.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SIEBER, O.M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I.P.M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Review**. V. 3, p. 701-708, 2003.

SIEDOW, J.N.; MOORE, A.L. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1059, p. 121–140, 1991.

SIKORSKA, M.; MATLAWSKA, H. Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 58, n. 4, p. 269- 272, 2001.

SILVA, J.S.V.; ABDON, M. M.; BOOCK, A.; SILVA, M.P. Fitofisionomias dominantes em parte das sub-regiões do Nabileque e Miranda, Sul do Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33 (número especial), p. 1713-1720, 1998.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, R. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p.449-454, 2002.

SILVA, A.D.; COST, D.A.; SILVA, D.F.; SOUZA, M.F.V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA- FILHO, J.M.; BRAZ- FILHO, R. Flavonóides glicosilado de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7- di-O-  $\alpha$ - L- ramnopiranosídeo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, 2005.

SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.N.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S.; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809- 1812, 2007.



SILVA, C. B.; SIMIONATTO, E. ; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E.S.; JUNIOR, A. W; CANDIDO, A. C.; SCALON, S.; POPPI, N. R.; FACCENDA, O. Composição Química e Atividade Alelopática do Óleo Volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 2373-2376, 2009a.

SILVA, L.B.; SILVA, W.; MACEDO, M.L.R.; PERES, M.T.L. Effects of *Croton urucurana* extracts and crude on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 3, p. 653-664, 2009b.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C., **Identificação. Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5ª ed., Guanabara. Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1994.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P.; Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315. 1984.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152- 172, 1999.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**. v. 82, p. 1107-1112, 1992.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M. & KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n.2, p. 191–198, 2005.

SMITH, M.A.; HARRIS, P.L.R.; SAYRE, L.M.; BECKMAN, J.S.; PERRY, G. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 3., p. 2653 -2657, 1997.

SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal Natural Product**, 67: 829–832, 2004.

SOUZA, M.S.; ANDRADE, G.M. Identidad de *Microlobius* y *Goldmania* (Mimosoideae: Mimoseae) y nuevas combinaciones. *Anales Instituto Biológico Universitario Nacional Autónomo*. **México: Série botânica**, v. 63, p. 101- 107, 1992.

SOUZA -FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Mecanismos de ação dos agentes alelopáticos. In: FILHO, A.P.S.S.; SÉRGIO,M.A. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**.1 ed. Embrapa. p.131-154, 2002.

SOUZA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade

antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA-FILHO, A. P. da S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., CROSSTHWAITE, A.J., KUHNLE, G., WILLIAMS, R.J., RICE-EVANS, C. Contrasting influences of glucuronidation and Omethylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1139-1146, 2001.

SPENCER, J.P.; KUHNLE, G.G.; WILLIAMS, R.J. RICE-EVANS, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. **Biochemistry Journal**, v. 372, p. 173–181, 2003.

STANIEK, K.; NOHL, H. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1413, p. 70–80, 1999.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v.42, n.1, p.1423-1426, 1967.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K.; Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p. 1887-1899, 1996.

STORRIE, B.; MADDEN, E.A., Cytochrome c oxidase. **Methods Enzymology**, v.182, p. 214-215, 1990.

SVENSSON, B. M.; MATHIASSEN, L.; MARTENSSON, L.; BERGSTROM, S. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachatewater from landfills. **Environmental Monit. Assessment**, v. 102, n. 1, p. 309-321, 2005.

TAETS, C.; AREF, S.; RAYBURN, A.L. The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environmental Health Perspectives*, v.106, n.197–201, 1998.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivasproblemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. **Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV**. *Química Nova*. 2009, vol.32, n.5, pp. 1189-1194. ISSN 0100-4042.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; THEVISSSEN, H. M. E.; BROEKAERT, W. F.; Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by

radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-1319, 1993.

THALANG, V.N.; TRAKOONTIVAKORN, G.; NAKAHARAK, K.; GASSINEE, T. Antioxidant activity of some commonly consumed leafy vegetables in Thailand. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**, v. 9, p. 35-43, 2001.

THALER, J.S. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. **Environmental Entomology**, v.28, p. 30-37, 1999.

THOMAS, P.; DOUGHTY, K. Disruption of rapid, nongenomic steroid actions by environmental chemicals: interference with progestin stimulation of sperm motility in Atlantic croaker. *Environmental Science and Technology* . v. 38, n.1. p. 6328–6332, 2004.

TIGRE, C.B. **Silvicultura para matas xerófilas**. Publicação n. 225, série I-A, DNOCS, Fortaleza-CE, 1968.

TOKURA, L. K.; NÓBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.

TOPASHKA-ANCHEVA, M.; METCHEVA, R.; TEODOROVA, S. A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 188- 193, p. 2003.

TORSSEL, B. G.; **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. New York: John Willey. 1989.

TSIMOGIANNIS, DIMITRIOS I. OREOPOULOU, VASSILIKI. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH• free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 7, n. 1–2, p. 140-146, 2006.

TSUTOMU, H.; TAEKO, Y.; RIEKO, Y.; YUKIHIKO, I.; MUNETO, M.; KAZUFUMI, Y.; ISAO, A.; SANSEI, N.; TADATAKA, N.; MASSAO, Y.; TAKUO, O. Inhibitory Effects of Galloylated Flavonoids on Xanthine Oxidase. **Planta Medica**, v. 57, p.83-84, 1991.

VAN HOORN, D.E.C.; NIJVELDT, R.J.; VAN LEEUWEN, P.A.M.; HOFMAN, Z., M'RABET, L.; DE BONT, D.B.A.; VAN NORREN, K. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 111-118, 2002.

ZHANG, X.Y.; CHAN, W.Y.; WHITNEY, B.M.; FAN, D.M.; CHOW, J.H.; LIU, Y, N, E.K.; CHUNG, S.C. Changes of interleukin expression correlate with *Helicobacter pylori* infection and lymph node metastases in gastric carcinoma. **Diagnosis Molecular Pathology**, v. 11, n. 3, p. 135- 139, 2002.

VALLILO, M.I.; CARUSO, M.F.S.; TAKEMOTO, E.; PIMENTEL, S.A. caracterização química e físico-química do óleo das sementes de *Platymiscium floribundum* Vog. (SACAMBU), colhidas na fase de desenvolvimento e na época de maturação fisiológica. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2007.

VAN DER WOUDE, H.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; STRUIJS, K.; SMEETS, A.; ALINK, GM.; RIETJENS, I.M. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. **Cancer Letters**, v. 200, p. 41–47, 2003.

VAN DER WOUDE, H.; TER VELD, M.G.; JACOBS, N.; VAN DER SAAG, P.T.; MURK, A.J.; RIETJENS, I.M.. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49:, p. 63–771, 2005.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging - a critical review. **Food Chemistry**. v. 95, n. 3, p. 357-381, 2006.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M; CUNHA, D.F.; FRANCO, M.V.M.J.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO- Jr.; A.A.J. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 31-44, jan./mar. 1998.

VEGNIA, F.E., M.L. PANCERIB, M.L., M. BIFFIC, M. Three scenarios of clinical claim reimbursement for nosocomial infection: the good, the bad, and the ugly. **Journal of Hospital Infection**. v. 56, p. 150–155, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

VENANCIO, T.M., CRISTOFOLETTI, P.T., FERREIRA, C., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., TERRA, W.R. “The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins.” **Insect Molecular Biology**. 18, 33-44, 2009.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, v. 35, p.753-759, 2008.

VERWEIJ, J.; JONGE, M.J.A. Achievements and future of Chemoterapy. **European .Journal of Cancer**. v. 36, n.1, p. 1479-1487, 2000.

VON HOFF, D.D. Use of radiometric system to screen for antineoplastic agents: correlation with a human tumor cloning system. **Cancer Research**, v. 45, n. 9, p. 4032-4038, 1985.

XAVIER-FILHO. Sementes e suas defesas contra insetos. **Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos**. Organizações dos Estados Americanos, p. 1-3, 1993.

ZHANG, Y.; LEWIS, K.; Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v.149, p.59-64. 1997.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Science**, v. 75, n. 14, p. 1659-1699, 2004.

ZHAO, W. M.; QIN, G. W.; LOU, L. G. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 1, p. 307-311, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J.A. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003.

YAMAZAKI, K.; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y.; MIYAMOTO, T.; SATO, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 1663-1665, 1994.

YANG, Y.J., DAVIES, D.M. "Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin." **Journal of Insect Physiology**, v. 17, pp. 117-131, 1971.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 43, n. 3, p. 27-32, 1995.

YU, J.Q.; YE, S.F.; ZHANG, M.F. & HU, W.H. Effects of root exudates and aqueous extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 129-139, 2003.

WANG, P.; Granado, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a *baculovirus* enhancing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6977–6982, 1997.

WEN, P-F.; CHEN, J-Y.; KONG, W-FU.; PAN, Q-H.; WAN, S-B.; HUANG, W-D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, v. 169, p. 928–934, 2005.

WESTPHAL, S.; KALTHOFF, H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. **Molecular Cancer**, v. 2, n. 1, p. 6 –20, 2003.

WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 28, p. 25-30, 1995.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides.** Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Fact sheet 117. 2009.

WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M., Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. **Journal Chemicals Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2141- 2154, 2000.

WU, J.H.; TUNG, Y.T.; WANG, S.Y.; SHYUR, L.F.; KUO, Y.H.; CHANG, S.T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5917-5921, 2005.

WU, J.F.; CHEN, S.B.; CHEN, S.L.; TU, P.F. The chemical constituents of *Polygala hongkongensis*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 45, n.7, p. 757-761, 2007.

WURDACK, J.J.; SMITH, L.B. Poligalaceas. In: REITZ, R. (ed). **Flora ilustrada Catarinense.** Itajaí: herbário Barbosa Rodrigues. 1971